

# Actividad proil-hidroxilasa hepática y concentración sérica del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III en la hepatopatía alcohólica

Miguel Torres Salinas

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TITULO:

ACTIVIDAD PROLIL-HIDROXILASA HEPATICA Y  
CONCENTRACION SERICA DEL PEPTIDO AMINO-  
TERMINAL DEL PROCOLAGENO TIPO III EN LA  
HEPATOPATIA ALCOHOLICA.

TESIS PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR  
POR LA FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSI-  
DAD DE BARCELONA.

PRESENTADA POR:  
MIGUEL TORRES SALINAS.

BARCELONA 1984.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

DON JUAN RODES TEIXIDOR, CATEDRATICO EN FUNCIONES DE LA CATEDRA DE  
PATOLOGIA Y CLINICA MEDICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD  
DE BARCELONA

C E R T I F I C A :           Que    la    Tesis    Doctoral    "Actividad  
                                  prolil-hidroxilasa hepática y concentración  
                                  sérica del péptido aminoterminal del  
                                  procolágeno tipo III en la hepatopatía  
                                  alcohólica" realizada por el Sr. D. Miguel  
                                  Torres Salinas, para aspirar al grado de  
                                  Doctor en Medicina, se halla en condiciones  
                                  de ser leída ante el tribunal  
                                  correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado,  
a petición del interesado , en Barcelona a cinco de diciembre de mil  
novecientos ochenta y cuatro.



*Conserver la santé et guérir les maladies :  
tel est le problème que la médecine a posé  
dès son origine et dont elle poursuit encore  
la solution scientifique.*

CLAUDE BERNARD

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Joan Rodés que me inició en la Hepatología, del que siempre he recibido consejos y estímulo y que fue quien promovió la temática de esta Tesis.

Al Dr. Miquel Bruguera por sus valiosos consejos, capacidad crítica y constante estímulo para el trabajo, agradeciéndole, además, el laborioso examen de las biopsias hepáticas de los pacientes incluidos en este estudio.

A los Dres. Joan Caballería y Albert Parés, por su eficaz contribución en la preparación de esta Tesis.

Al Biólogo Wladimiro Jiménez por sus sugerencias y contribución al desarrollo de las técnicas de laboratorio utilizadas en esta investigación.

Al Dr. Daniel Heredia por su generosa colaboración en distintos aspectos de esta Tesis.

Al Dr. Antonio M. Ballesta por sus consejos y ayuda científica.

Al Hospital Clínico y Provincial de Barcelona y al Instituto Nacional de la Salud, gracias a cuya ayuda económica ha podido realizarse esta Tesis.

## I N D I C E

### P A R T E T E O R I C A

#### A). ALTERACIONES HEPATICAS PRODUCIDAS POR EL ALCOHOL.

- Epidemiología del alcoholismo. 1
- Epidemiología de las enfermedades hepáticas producidas por el alcohol. 3
- Metabolismo hepático del alcohol. 6
  - 1. Oxidación del alcohol. 6
  - 2. Consecuencias de la oxidación del alcohol. 9
    - Efectos de la oxidación del alcohol sobre los hepatocitos. 10
    - Consecuencias metabólicas de la oxidación del alcohol. 13
- Patogenia de las enfermedades hepáticas inducidas por el alcohol. 19
- Enfermedades hepáticas de etiología alcohólica. 22
- Diagnóstico biológico del alcoholismo. 30
- Tratamiento de la hepatopatía alcohólica. 34

## B). FIBROGENESIS HEPATICA.

### NATURALEZA DEL TEJIDO CONJUNTIVO HEPATICO.

- Colágeno. 38
- Glucoproteínas. 43
- Proteoglicanos y glicosaminoglicanos. 46

### METABOLISMO DEL COLAGENO.

- Estructura de las moléculas de colágeno. 48
- Biosíntesis de las cadenas de procolágeno. 52
  - Transcripción y traducción 53
  - Modificaciones postraduccionales. 56
    - Hidroxilación de los residuos de prolina y lisina. 56
    - Glicosilación de los residuos de hidroxilisina. 61
    - Glicosilación de los péptidos terminales y formación de puentes disulfuro. 62
    - Formación de la triple hélice. 63
    - Secreción de las moléculas de procolágeno. 65
- Modificaciones extracelulares. 66
  - Conversión de las moléculas de procolágeno en colágeno y formación de



fibrillas.	66
- Formación de enlaces intra e inter- moleculares.	69
- Formación de fibras de colágeno.	71
- Degradación del colágeno.	73
- Regulación del metabolismo del colágeno.	76
- Funciones del colágeno en el tejido con- juntivo.	78
- Enfermedades metabólicas del colágeno.	81
- Enfermedades del colágeno hereditarias.	81
- Enfermedades del colágeno adquiridas.	86

C). FIBROSIS HEPATICA ALCOHOLICA.

- Naturaleza de la cicatriz en la cirrosis hepática.	94
- Células involucradas en la síntesis de colágeno.	96
- Fenómeno de contracción de la cicatriz.	98
- Alteraciones metabólicas de la fibrosis hepática alcohólica.	100
- Prolina y ácido láctico en el meta- bolismo del alcohol.	100
- Acido láctico y fibrogénesis.	101
- Daño hepático y respuesta fibrogénica.	103

- Dinámica de la fibrosis hepática: biosíntesis versus degradación.	106
- Métodos para medir la fibrosis.	110
- Exámen de la biopsia hepática.	110
- Determinaciones en tejido hepático.	112
- Determinaciones en líquidos biológicos.	118
- Fármacos antifibrogénicos.	127

## P A R T E P R A C T I C A

A). <u>MATERIAL Y METODOS.</u>	
A <sub>1</sub> ). MATERIAL.	132
1. Obtención de la muestra de tejido hepático.	
2. Obtención de la muestra de suero.	
A <sub>2</sub> ). METODOS.	134
1. Determinación de la actividad prolil-hidroxilasa en el tejido hepático.	
1.1. Fundamento.	
1.2. Preparación del sustrato marcado.	135
1.3. Ensayo de la actividad prolil-hidroxilasa en tejido hepático.	138
1.3.1. Homogeneización.	
1.3.2. Incubación.	
1.3.3. Destilación.	
1.3.4. Resultado.	
1.4. Validación del método.	143
1.4.1. Linearidad del ensayo.	
1.4.2. Cinética de incubación.	
1.4.3. Conservación del sustrato marcado.	
1.4.4. Precisión.	
1.4.4.1. Intraensayo.	
1.4.4.2. Interensayo.	

2. Determinación sérica del péptido amino-terminal del procolágeno tipo III (P-III-P).	150
2.1. Radioinmunoanálisis.	
2.2. Validación del método.	153
2.2.1. Precisión.	
2.2.1.1. Intraensayo.	
2.2.1.2. Interensayo.	
2.2.2. Sensibilidad.	
2.2.3. Exactitud.	
3. Análisis histológico de la biopsia hepática.	157
3.1. Diagnóstico histológico.	
3.2. Intensidad de la fibrosis.	158
3.3. Otras alteraciones histológicas.	
4. Cálculo estadístico.	159
B). <u>RESULTADOS</u> .	
1. Análisis histológico de la biopsia hepática en la hepatopatía alcohólica.	161
2. Actividad prolil-hidroxilasa (PH-asa) en tejido hepático en la hepatopatía alcohólica.	166
2.1. Variaciones de la actividad prolil-hidroxilasa hepática según el diagnóstico histológico.	

2.2. Relación entre la actividad prolil- hidroxilasa hepática y la intensidad de la fibrosis.	169
2.3. Relación entre la actividad prolil- hidroxilasa hepática y otras altera- ciones histológicas.	170
3. Concentración sérica del péptido ami- noterminal del procolágeno tipo III (P-III-P) en la hepatopatía alcohólica.	174
3.1. Variaciones de la concentración sé- rica de P-III-P según el diagnóstico histológico.	
3.2. Relación entre la concentración séri- ca de P-III-P y la intensidad de la fibrosis.	178
3.3. Relación entre los niveles séricos de P-III-P y otras alteraciones his- tológicas.	179
4. Relación entre la actividad prolil-hi- droxilasa hepática y la concentración sérica del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III en la hepatopatía alcohólica.	188

5. Análisis de la actividad prolil-hidroxilasa y de la concentración sérica del péptido aminoterminal del procógeno tipo III en los pacientes con hepatitis alcohólica.	138
DISCUSION	194
RESUMEN Y CONCLUSIONES	213
BIBLIOGRAFIA	224

## J U S T I F I C A C I O N   Y   O B J E T I V O S D E   L A   T E S I S .

La mayoría de enfermedades hepáticas crónicas se caracterizan por la existencia de un depósito progresivo de colágeno que comporta una alteración creciente de la arquitectura hepática hasta llegar a una cirrosis. Esta desestructuración hepática ocasionada por la fibrosis es la responsable de la aparición de una hipertensión portal que es la desencadenante de la mayoría de complicaciones graves como la hemorragia digestiva, la ascitis y la encefalopatía hepática que presentan los pacientes hepatópatas crónicos en fase de cirrosis.

En los pacientes alcohólicos crónicos que desarrollan una hepatopatía pueden observarse lesiones histológicas variadas que van desde mínimos cambios morfológicos hasta una cirrosis plenamente establecida. Como pasos intermedios, aunque no necesariamente consecutivos, existen lesiones de esteatosis, fibrosis y hepatitis alcohólica. Es por ello que la hepatopatía alcohólica puede considerarse un buen modelo para el estudio de los procesos de fibrogénesis y de fi-

brosis hepática.

La evolución de la enfermedad hepática alcohólica hacia la cirrosis o la curación, es poco conocida, si bien es posible que algunos factores como la abstinencia, el sexo y el hábito nutricional puedan influir en esta evolución. Ultimamente se han iniciado algunos ensayos terapéuticos con distintos fármacos antifibrogénicos con el fin de conocer si tienen alguna influencia en la evolución de la hepatopatía alcohólica.

Para conocer el estado evolutivo de la enfermedad hepática alcohólica el método más fidedigno consiste en el análisis morfológico de una biopsia hepática. También se ha utilizado la determinación de la actividad hepática de algunas enzimas que intervienen en la síntesis del colágeno. Entre estas enzimas la más conocida es la prolil-hidroxilasa que interviene en el proceso de hidroxilación de la prolina en las cadenas proalfa del procolágeno. Todos estos métodos implican la realización de una biopsia hepática, técnica invasiva que condiciona que no se pueda realizar con la frecuencia deseable para conocer la evolución de los procesos fibrogénicos hepá-



ticos.

Recientemente se ha introducido una técnica de radioinmunoanálisis que permite detectar la concentración sérica del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III originado durante la síntesis de colágeno en el momento que la molécula de procolágeno pierde las cadenas peptídicas amino y carboxiterminales. La concentración sérica de este péptido se ha encontrado elevada en la mayoría de enfermedades hepáticas, y su significado todavía no está completamente establecido.

Los objetivos propuestos en esta Tesis son:

- 1º Determinar si la actividad hepática de la prolil-hidroxilasa está relacionada con la extensión de la fibrosis en la hepatopatía alcohólica.
- 2º Investigar si en la hepatopatía alcohólica hay un incremento de los niveles séricos del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III y si su determinación permite distinguir entre los distintos tipos de enfermedad hepática alcohólica.
- 3º Analizar si las variaciones en los niveles sé-

ricos del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III están relacionados con la intensidad de la fibrosis hepática y con las demás lesiones histológicas que presentan los pacientes afectados de una hepatopatía alcohólica.

PARTE TEORICA

A). A L T E R A C I O N E S   H E P A T I C A S  
P R O D U C I D A S   P O R   E L   A L C O H O L .

EPIDEMIOLOGIA DEL ALCOHOLISMO

El consumo de bebidas alcohólicas representa un problema médico de primera magnitud con grave repercusión social y económica en todos los países del mundo, especialmente en aquellos productores de vino. Nuestro país ocupa el tercer lugar en la producción mundial de vino precedido sólo de Francia e Italia. Estudios epidemiológicos realizados en diversas regiones españolas coinciden en demostrar que el 70% de los españoles son consumidores de alcohol aunque sólo la mitad lo hacen regularmente, que existe un 10% de adultos que son bebedores excesivos y que el 50% de varones y mujeres menores de 20 años consumen bebidas alcohólicas (1).

El consumo excesivo de alcohol tiene consecuencias médicas, tanto somáticas como psíquicas, muy importantes y se acompaña de una gran morbilidad y mortalidad. Existen estudios que demuestran que de un 20-30% de los pacientes que ingresan en un Servicio de Medicina Interna de un Hospital General lo hacen por enfermedades rela-

cionadas directa o indirectamente con el alcohol (2) y que un 40% de los ingresos psiquiátricos, según datos de la Dirección General de Sanidad, están relacionados con el alcoholismo. En 1977 se estimaron en España unos 12.000 fallecimientos atribuidos al alcoholismo con un índice de mortalidad proporcional del 4,4% y con una tasa de mortalidad del 35,5 por 100.000 habitantes, que colocaría a esta enfermedad en la cuarta causa de mortalidad detrás de las enfermedades cardiovasculares, las neoplasias y los accidentes (3).

Las repercusiones sociales y de carácter económico del alcoholismo son también graves. Las consecuencias del comportamiento del alcohólico sobre el entorno familiar, laboral y social repercuten en el resto de la población. Los gastos directos e indirectos ocasionados por el consumo excesivo de alcohol (hospitalización, medicamentos, accidentes laborales, domésticos y de tráfico, absentismo laboral, etc) son muy elevados.

EPIDEMIOLOGIA DE LAS ENFERMEDADES HEPATICAS PRODUCIDAS POR EL ALCOHOL.

En estudios experimentales y de tipo epidemiológico se demuestra una clara relación causal entre el alcoholismo y la aparición de enfermedades hepáticas de origen alcohólico, así como una relación directa entre disponibilidad de bebidas alcohólicas, consumo de alcohol y aumento de la mortalidad por cirrosis alcohólica (4).

Los primeros datos que relacionaban el consumo de alcohol y la mortalidad por cirrosis fueron comunicados por Jollife y Jenillek en 1941 (5). Esta asociación fué confirmada posteriormente al apreciarse una disminución de la mortalidad por cirrosis en épocas de prohibición o racionamiento y su posterior reascenso (6). Las lesiones hepáticas de origen alcohólico son al parecer independientes del tipo de bebida consumida y de los aditivos que contenga. En cambio, como muestran los estudios de Lebach (7), sí existe relación entre la cantidad de alcohol ingerido, duración del hábito alcohólico y la intensidad de la hepatopatía. La incidencia de hepatitis alcohólica y/o cirrosis, en este estudio, aumentó en relación al consumo de alcohol y la cirrosis se

presentó en el 40% del grupo de pacientes que bebieron más cantidad durante más tiempo. Sin embargo, el 60% de los pacientes que consumieron cantidades importantes de etanol (más de 200g/día), durante un período superior a 10 años, presentaron mínimas o nulas alteraciones en la biología hepática. Estos estudios sugieren que la ingesta excesiva y prolongada de alcohol no es el único factor determinante para la aparición de una hepatopatía alcohólica y que deben existir otros factores como determinantes genéticos, nutricionales o ambientales que puedan influir en su aparición.

Los estudios efectuados en Francia por Pequinot (8) parecen demostrar que la ingesta diaria de etanol puro es bien tolerada por el organismo cuando no supera los 80 g/día. Cuando la ingesta diaria se sitúa entre 80 y 160 g de alcohol puro al día representa un riesgo considerable y cuando supera los 160 g/día por un período superior a 25 años, la posibilidad de adquirir una cirrosis hepática es muy elevada. Estas cifras están calculadas para individuos varones y deberían reducirse, a la mitad aproximadamente, para ser aplicadas a la mujer, dada su mayor suscepti-

bilidad para adquirir una hepatopatía alcohólica.

En España los estudios publicados por Gili et al (3) muestran que en 1977 el 70% de las cirrosis hepáticas son de origen alcohólico y que la tasa de mortalidad estandarizada por cirrosis, que en 1951 era de 11,18 por 100.000 habitantes, ha pasado a ser del 21,5 por 100.000 habitantes en 1977. Estos datos corren paralelos al aumento de consumo de bebidas alcohólicas. En 1955 el consumo de alcohol puro por habitante y año fué de 7,86 litros pasando a ser de 14,56 en 1977 (9).



## METABOLISMO HEPATICO DEL ALCOHOL.

### 1). OXIDACION DEL ALCOHOL.

El alcohol ingerido por vía oral se absorbe en el estómago, intestino delgado y colon. Algo más del 90% del alcohol absorbido se metaboliza en el hígado, el resto se elimina por el aliento y la orina y una mínima cantidad es metabolizado en diversas partes del organismo (riñón, músculo, e intestino).

En el interior de la célula hepática el etanol sufre dos procesos oxidativos mediante los cuales pasa a acetato, substancia adecuada para incorporarse al ciclo de Krebs. El primer paso oxidativo consiste en la formación de aldehído acético o acetaldehído. En el hombre intervienen fundamentalmente tres vías oxidativas. La más importante es la catalizada por la enzima alcoholdehidrogenasa (ADH), paso que tiene lugar en el citoplasma celular. Le siguen en importancia la vía descrita por Lieber et al (10), localizada en el retículo endoplásmico liso y conocida como sistema oxidativo microsomal para el etanol (MEOS) y la vía de las catalasas que en el hombre prácticamente carece de actividad (fig 1). En la vía

de la ADH interviene como cofactor el dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD) que actúa como receptor de hidrogeniones y se convierte en NAD reducido (NADH). Los hidrogeniones son transportados a las mitocondrias donde el NADH se convierte de nuevo en NAD. La vía del MEOS precisa como cofactor el NADPH que se oxida pasando a NADP con consumo de oxígeno y la vía de las catalasas precisa  $H_2O_2$  el cual se genera por la acción de una enzima microsomal, la NADPH-oxidasa en presencia de NADPH y  $O_2$ .

En condiciones normales el sistema ADH representa el 80% de la capacidad oxidativa del alcohol y el MEOS el 20% restante. En los alcohólicos crónicos la actividad del MEOS se adapta a las necesidades comportando una desaparición más rápida en sangre del alcohol ingerido. En casos de ingestas de alcohol muy notables pueden llegar a invertirse los porcentajes de oxidación del MEOS respecto a la ADH, ya que el sistema ADH carece de capacidad adaptativa.

El segundo paso oxidativo tiene lugar a nivel del citoplasma celular y las mitocondrias por acción de una única vía metabólica mediada por la enzima aldehído-dehidrogenasa (ALDH) y la in-

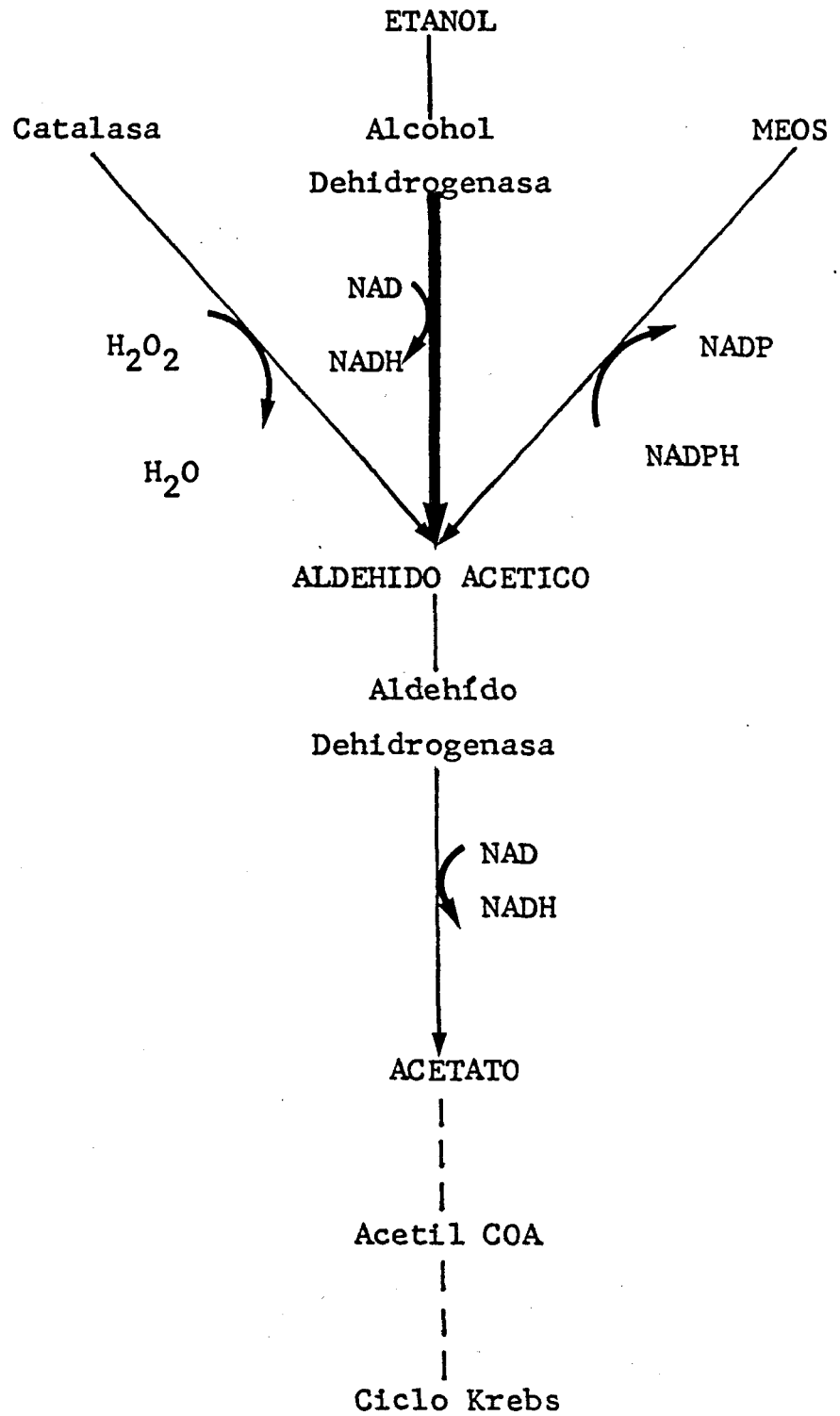


Figura 1.

tervención nuevamente del NAD que se reduce a NADH.

En los alcohólicos crónicos se ha demostrado experimentalmente que existe un aumento de la concentración plasmática de acetaldehído. Este hecho puede ser debido tanto a un aumento de la oxidación del etanol al incrementarse la actividad del sistema MEOS como a una disminución en la oxidación del acetaldehído por una deficiencia o inhibición de la enzima ALDH (11).

El aumento de la concentración de acetaldehído en sangre es responsable de reacciones adversas tales como flushing y náuseas, mecanismo por el que actúa la medicación aversiva (disulfiram, cianamida), y de otros efectos más serios del abuso alcohólico como son la adicción, la abstinencia y la hepatotoxicidad (12).

## 2). CONSECUENCIAS DE LA OXIDACION DEL ALCOHOL.

El aumento de la concentración sanguínea de acetaldehído que existe en los alcohólicos crónicos y la alteración del equilibrio redox por acúmulo excesivo de hidrogeniones, debido al aumento del cociente NADH/NAD de hasta cuatro veces su valor normal, son los responsables de la mayoría

de las alteraciones morfológicas y funcionales de los hepatocitos y de ciertos trastornos metabólicos.

Efectos de la oxidación del alcohol sobre los hepatocitos.

En el estudio histológico del hígado de los alcohólicos examinado al microscopio óptico puede reconocerse diversas alteraciones morfológicas. Unas son de carácter adaptativo y no se acompañan de ningún déficit funcional y otras son consecuencia de la agresión sobre las organelas celulares (13) y pueden traducirse en alteraciones clínicas y biológicas.

- Megamitocondrias.

El acetaldehído en exceso que presentan los alcohólicos crónicos penetra en las mitocondrias para ser oxidado y determina alteraciones en la forma y tamaño de las mismas. Aparecen mitocondrias gigantes que adoptan un aspecto globular o tubular al microscopio electrónico mientras que al microscopio óptico aparecen como inclusiones citoplasmáticas globulares o acidulares de bordes nítidos que han sido denominadas megamitocondrias (14). Pueden encontrarse en el hígado de pacientes alcohólicos de forma aislada

o bien acompañando a otras lesiones como esteatosis, hepatitis alcohólica o cirrosis. Se requiere siempre el antecedente de un alcoholismo intenso y que no exista un intervalo de tiempo importante de abstinencia al realizar la biopsia. Con menor frecuencia, las megamitocondrias pueden observarse en pacientes no alcohólicos, por lo que su hallazgo en una biopsia hepática, aunque es un índice de sospecha de alcoholismo, no es patognomónico de esta enfermedad.

- Vacuolas grasas.

Están constituidas por depósitos de triglicéridos en el citoplasma celular que al microscopio óptico adoptan un aspecto claro. Su aparición está relacionada con el aumento de la síntesis de ácidos grasos a partir del exceso de hidrogeniones, consecutivo a la oxidación del alcohol y con la disminución de la oxidación de los ácidos grasos de la dieta en la mitocondria, al inhibirse el ciclo de krebs mitocondrial. Estos ácidos grasos en exceso se esterifican en triglicéridos, quedan depositados en el citoplasma en número y distribución variables y desaparecen a las pocas semanas de abstinencia.

- Balonamiento de los hepatocitos.

Aparece como consecuencia de un atrapamiento en el interior de los hepatocitos de parte de aquellas proteínas que se sintetizan en ellos y que luego se secretan como la albúmina y la transferrina. Se debe a una alteración de los microtúbulos producida por el acetaldehído. La disminución de la secreción celular de estas proteínas ocasiona una retención mayor de agua para mantener la osmolaridad citoplasmática. Estas células en degeneración hidrópica se sitúan alrededor de las venas hepáticas terminales, son de mayor tamaño que el resto de hepatocitos y poseen un citoplasma más claro, efecto de la dilución del colorante que se aplica en la tinción. Probablemente constituye la fase previa de la necrosis celular causada por el alcohol.

- Hialina de Mallory.

Está constituida por agregados irregulares de material hialino intensamente eosinófilos que se sitúa alrededor del núcleo en hepatocitos generalmente en degeneración hidrópica. Aunque su origen real no está bien establecido podrían corresponder a filamentos intermedios de las células hepáticas que se acumularían tras el daño

que el alcohol ocasiona sobre los microtúbulos. Su hallazgo en una biopsia hepática es altamente sugestivo de hepatopatía alcohólica cuando se asocia a un infiltrado polimorfonuclear. No obstante, no es imprescindible para establecer el diagnóstico de hepatitis alcohólica y puede encontrarse en otro tipo de hepatopatías no alcohólicas, que presentan un patrón morfológico similar a las hepatopatías alcohólicas como la asociada al by-pass intestinal, diabetes mellitus y obesidad o se caracterizan por colestasis como ocurre en la cirrosis biliar primitiva, el carcinoma hepatocelular y la enfermedad de Wilson.

#### Consecuencias metabólicas de la oxidación del alcohol.

##### - Lípidos.

El alcohol modifica el metabolismo de los lípidos plasmáticos y de los lípidos de las células hepáticas. Por una parte inhibe la oxidación de ácidos grasos y por otra estimula su síntesis. Posteriormente se esterifican con glicerol proveniente del alfa-glicerofosfato con el consiguiente aumento de triglicéridos hepáticos. Existe también un incremento de la síntesis de lipo-



proteínas y un aumento de los triglicéridos y colesterol séricos, que justifica la hiperlipemia observada en gran número de alcohólicos crónicos. (15).

- Proteínas.

El alcohol produce, por un lado, una disminución en la síntesis proteica a nivel hepatocelular y, por otro, disminuye la secreción de las proteínas sintetizadas en los ribosomas adheridos al retículo endoplásmico y que han de ser secretadas al plasma como son la albúmina y la transferrina con la subsiguiente acumulación y retención de agua en el hepatocito (balonamiento celular). Las proteínas producidas y acumuladas en el hígado, como la ferritina (sintetizada a nivel de los ribosomas), no sufren estos cambios acumulativos (15).

- Hidratos de carbono.

La alteración más importante que el alcohol produce sobre el metabolismo hepático de los hidratos de carbono es interferir la síntesis de glucosa. Aunque el alcohol no inhibe la hidrólisis de glucógeno a glucosa hepáticos, en cambio sí inhibe la neoglucogénesis (16) como consecuencia del aumento del NADH en el citoplasma celular.

Cuando una persona sana o un alcohólico, ingiere alcohol en circunstancias en las que no exista reserva de glucógeno hepático (ayuno de más de 48 horas), puede presentar una hipoglicemia que es causa de muerte súbita en algunos individuos alcohólicos.

- Acido úrico.

Uno de los efectos mejor conocidos del alcohol es la depresión que causa sobre la excreción urinaria de ácido úrico. El metabolismo oxidativo del alcohol produce un aumento del cociente NADH/NAD y del cociente lactato/piruvato (17). La hiperlactacidemia contribuye a la aparición de acidosis láctica, generalmente poco severa, y también reduce la capacidad del túbulo distal del riñón para excretar ácido úrico con la subsiguiente hiperuricemia. Este es el mecanismo que explica la asociación bastante común de gota y alcoholismo crónico. El aumento del ácido láctico sérico ha sido reconocido, mas recientemente, como un potente estímulo inductor de fibrogénesis hepática en los alcohólicos crónicos (18).

- Porfirinas.

La intoxicación alcohólica aguda o crónica ocasiona un aumento de la actividad de la enzima

delta-amino-levulínico-sintetasa en las mitocondrias de la célula hepática. Este fenómeno de inducción enzimática que provoca el alcohol podría explicar el aumento urinario de las coproporfirinas que acompañan a la intoxicación alcohólica y el desencadenamiento de crisis porfíricas en individuos con porfiria hepática (13).

- Cetosis y cetoacidosis alcohólica.

La cetosis que inicialmente se atribuía a una deficiente nutrición en el alcohólico no ha sido confirmada al demostrarse la persistencia de la misma cuando se administra una dieta calórica adecuada acompañada de alcohol. Su mecanismo de aparición no está bien clarificado aunque se relaciona con alguna alteración de la función mitocondrial producida por el alcohol.

La existencia de cetoacidosis en un paciente alcohólico recoge generalmente el antecedente de una ingesta reciente. Clínicamente se manifiesta por náuseas, vómitos y anorexia y se aprecian signos de deshidratación, taquicardia, respiración de Kussmaul, dolor abdominal y estupor. Los análisis de laboratorio muestran una acidosis metabólica. Puede existir únicamente una débil cetonuria si es valorada en tiras reactivas con-

vencionales, dado que estas son casi insensibles al 3-hidroxiacetil-CoA que es el cuerpo cetónico que más se eleva en estos casos. Este cuadro clínico debe diferenciarse de una hipoglucemia, acidosis láctica o una pancreatitis (19).

- Medicamentos.

La ingesta crónica de alcohol, al igual que algunos fármacos, produce una hipertrofia del retículo endoplásmico liso que se acompaña de un aumento de la actividad del citocromo P-450.

Esta adaptación metabólica contribuye a la tolerancia que los alcohólicos, en estado de sobriedad, tienen para ciertos fármacos como los sedantes. En contraste con este fenómeno la intoxicación alcohólica aguda potencia la acción de los tranquilizantes tomados simultáneamente al retrasar su metabolización y, por consiguiente, su aclaramiento hepático, puesto que los enzimas que intervienen en este proceso están ocupados en metabolizar el alcohol ingerido (19).

- Hormonas.

El hipogonadismo y la ginecomastia se asocian comúnmente a la cirrosis alcohólica en el varón y se deben tanto a alteraciones gonadales primarias como del eje hipotálamo-hipofisario.

Recientes observaciones indican que el alcohol produce alteraciones directas en el metabolismo de la testosterona con disminución de su síntesis y aumento de su catabolismo en alcohólicos no cirróticos. También se han descrito alteraciones en el metabolismo estrogénico asociadas a hepatopatía (19).

PATOGENIA DE LAS ENFERMEDADES HEPATICAS INDUCIDAS  
POR EL ALCOHOL.

Actualmente está bien establecido que el alcohol ejerce un efecto tóxico directo sobre el hígado. El daño hepático inducido por el alcohol se produce simultáneamente en dos sentidos. Por una parte, produce alteraciones funcionales y estructurales en las distintas organelas de los hepatocitos, citadas anteriormente, cuya última consecuencia es la necrosis celular con una reacción inflamatoria alrededor de los focos de necrosis (20). En segundo lugar, el alcohol altera el metabolismo hepático del colágeno provocando un progresivo aumento de las fibras de colágeno hasta llegar al estadio de cirrosis hepática (21). La fibrosis y la consiguiente formación de nódulos de regeneración condicionan una desestructuración de la arquitectura y circulación normales del hígado y es la responsable, entre otras alteraciones, de la hipertensión portal y la insuficiencia hepatocelular, que son manifestaciones clínicas propias de la hepatopatía alcohólica en fase avanzada.

La acumulación excesiva de colágeno hepático puede ser el resultado del aumento de su

síntesis, disminución de su degradación o la combinación de ambos procesos (20). El colágeno se sintetiza en forma de un precursor (procolágeno) y en su síntesis intervienen los fibroblastos, los hepatocitos, las células de Ito o lipocitos perisinusoidales y los miofibroblastos (sólo observables en hígados cirróticos). La necrosis y la inflamación son un estímulo muy importante para incrementar la síntesis de colágeno, aunque ésta pueda iniciarse en ausencia de necrosis. Actualmente se conoce que el alcohol tiene un efecto directo sobre el metabolismo del colágeno, principalmente a través del exceso de producción de ácido láctico, que estimula la acción de la prolil-hidroxilasa, enzima que interviene en la síntesis de colágeno e inhibe la prolil-oxidasas enzima necesaria para su degradación (18). La fibrogénesis inducida por el alcohol en el hígado es un proceso relativamente lento y existe un período de tiempo en el que las lesiones hepáticas son potencialmente reversibles (22), circunstancia que puede tener posteriores connotaciones terapéuticas.

Un hecho de gran importancia fisiopatológica y también con implicaciones terapéuticas es

que tanto la necrosis celular como la fibrogénesis se inician alrededor de la vena centrolobulillar. El alcohol precisa para su metabolismo una cantidad elevada de oxígeno produciendo una hipoxia relativa en la zona 3 del acino, que es la peor oxigenada en condiciones normales. La hipoxia sería el factor favorecedor de la aparición de las lesiones en esta zona centrolobulillar.(20).

Además del efecto tóxico directo del alcohol, en la patogenia de las enfermedades por él inducidas, intervienen otros factores no bien conocidos como la nutrición, factores genéticos y alteraciones inmunológicas.



ENFERMEDADES HEPATICAS DE ETIOLOGIA ALCOHOLICA.

El alcohol puede ocasionar distintos cuadros anatomoclínicos (esteatosis, hepatitis alcohólica, cirrosis hepática y colestasis) que pueden presentarse aisladamente, si bien lo más común es que se presenten combinados entre sí. Habitualmente, su aparición está en relación con la intensidad y duración de la enfermedad alcohólica, datos anamnésicos difíciles de recoger en estos pacientes. Se desconocen los mecanismos íntimos de por qué no se afectan todos los sujetos alcohólicos con la misma intensidad y por qué estos pacientes presentan una u otra enfermedad. La gran superposición de manifestaciones clínicas y biológicas que suelen existir en los diferentes cuadros de la enfermedad alcohólica hacen aconsejable la práctica de la punción biopsia del hígado que permita establecer el diagnóstico y cuantificar en cada caso el grado de lesión. La biopsia hepática es también útil para establecer el diagnóstico de enfermedades no alcohólicas que inciden en pacientes alcohólicos.

ESTEATOSIS

Es la lesión hepática inducida por el alcohol

de observación más frecuente y que traduce la alteración que éste ejerce sobre el metabolismo lipídico a nivel de la célula hepática. Se caracteriza por el depósito de vacuolas grasas en cantidad y tamaño variables en el interior de los hepatocitos sin alteración de la estructura hepática. En ocasiones el crecimiento de las vacuolas grasas puede provocar la ruptura de las membranas celulares con extravasación de lípidos al intersticio y formación de una reacción inflamatoria de carácter granulomatoso, que se denomina lipogranuloma.

La esteatosis hepática suele ser asintomática y/o se acompaña de una hepatomegalia blanda y con nulas o mínimas alteraciones de las pruebas de laboratorio. Se puede considerar como un proceso benigno que retrograda en poco tiempo con la abstinencia pero puede también evolucionar a hepatopatías más graves si persiste la ingesta de alcohol. Los pacientes que presentan esteatosis hepática acompañada de esclerosis de las venas centrolobulillares pueden evolucionar a formas más avanzadas de hepatopatía alcohólica (23).

### HEPATITIS ALCOHOLICA

Su forma clínica de presentación puede ser muy variable y va desde formas asintomáticas a formas de gran afectación hepatocelular. El cuadro clínico más habitual consiste en ictericia, dolor en hipocondrio derecho, fiebre y leucocitosis con alteraciones biológicas que indican daño celular como son elevación de las transaminasas, habitualmente moderada, con predominio de la GOT sobre la GPT, hiperbilirrubinemia conjugada de intensidad variable y gran elevación de la gammaglutamiltranspeptidasa y fosfatasa alcalina (24).

Otras formas clínicas incluyen manifestaciones de hepatopatía crónica, forma pseudotumoral con soplo audible en la superficie hepática (por anastomosis arteriovenosas intrahepáticas), que obliga al diagnóstico diferencial con el carcinoma hepatocelular, y forma fulminante con síntomas y signos de insuficiencia hepatocelular grave que conduce a la muerte del paciente en breve espacio de tiempo, generalmente a través de una insuficiencia renal funcional. En ocasiones esta enfermedad es totalmente asintomática y puede manifestarse únicamente con una hepatomegalia y mínimas

alteraciones de las pruebas hepáticas, siendo el estudio histológico hepático el único que puede establecer el diagnóstico en estos casos.

El sustrato morfológico de la hepatitis alcohólica es común en todas las variantes clínicas aunque su intensidad es variable y puede observarse aislado o asociado a otras lesiones hepáticas de etiología alcohólica como son esteatosis, fibrosis o cirrosis. El patrón morfológico de la hepatitis alcohólica consiste en áreas de necrosis celular, de localización preferentemente centrolobulillar, con infiltración inflamatoria por leucocitos polimorfonucleares. Incluye también hepatocitos en degeneración hidrópica algunos de los cuales contienen hialina de Mallory. Como hemos visto anteriormente la hialina de Mallory no es exclusiva de la hepatopatía alcohólica pero su asociación con necrosis de localización centrolobulillar e infiltración polimorfonuclear los hace característicos de la hepatopatía alcohólica. Las lesiones de necrosis celular centrolobulillar progresan con frecuencia a una esclerosis hialina de la vena centrolobulillar que comporta el desarrollo de hipertensión portal y justifica la aparición de ascitis y

hemorragia digestiva sin necesidad de existir una cirrosis hepática asociada.

La hepatitis alcohólica es una lesión que comporta una mortalidad elevada en fase aguda, alrededor del 15% según diferentes series estudiadas. Existen unos signos clínicos y biológicos que confieren un pronóstico desfavorable al curso de una hepatitis alcohólica como son la existencia de encefalopatía, una tasa de protrombina inferior al 50% que no mejore tras la administración de vitamina K, una cifra de bilirrubina superior a 12 mg/dl, niveles bajos de albúmina y la elevación de las cifras de nitrógeno uréico plasmático (25). En aquellos pacientes que superan la fase aguda, sus lesiones revierten con la abstinencia en la mayoría de ocasiones. Sin embargo, en un porcentaje no desdeñable de casos las lesiones histológicas persisten o incluso progresan a cirrosis. De todos modos, las probabilidades de desarrollar una cirrosis son mucho mayores para los pacientes que siguen bebiendo alcohol.

#### COLESTASIS AGUDA ALCOHOLICA

En ocasiones, la hepatitis alcohólica se

manifiesta como una colestasis de instauración aguda. En estos casos el diagnóstico es particularmente difícil, especialmente cuando el paciente no reconoce una ingesta importante de alcohol. Este cuadro clínico obliga a hacer el diagnóstico diferencial con la colecistitis, absceso hepático y pancreatitis crónica alcohólica. El diagnóstico sólo se establece con la biopsia hepática, que debe practicarse una vez descartadas las causas de colestasis extrahepática mediante la ecografía o colangiografía retrógrada.

Ocasionalmente la colestasis se asocia a hiperlipemia y anemia hemolítica, junto a una esteatosis masiva observable en la biopsia hepática determinando el cuadro clínico conocido como síndrome de Zieve (26).

Más recientemente se han descrito casos de colestasis simple sin lesiones de hepatitis alcohólica asociada, atribuidos a un efecto tóxico del alcohol a nivel del sistema excretor biliar del hepatocito. El cuadro histológico consiste en una colestasis centrolobulillar asociada en algunos casos a fibrosis (27).

### CIRROSIS HEPATICA ALCOHOLICA

La evolución de la hepatitis alcohólica a cirrosis ha sido ampliamente reconocida y se acepta que la hepatitis alcohólica es el precursor más importante de cirrosis alcohólica, aunque también puede desarrollarse una cirrosis tras una fibrosis progresiva sin cambios histológicos de hepatitis alcohólica (fig 2).

El patrón morfológico es el de una cirrosis micronodular en el que pueden identificarse otras lesiones de origen alcohólico (esteatosis, hepatitis alcohólica) con manifestaciones clínicas similares a las de la cirrosis de otra etiología.

El pronóstico de la cirrosis hepática alcohólica es variable, según las series estudiadas por diferentes autores, pero la supervivencia mejora en todos los casos con el abandono del hábito alcohólico. En los individuos alcohólicos que dejan de beber la cirrosis puede adoptar un patrón macronodular y en esta etapa pueden desarrollar un carcinoma hepatocelular.

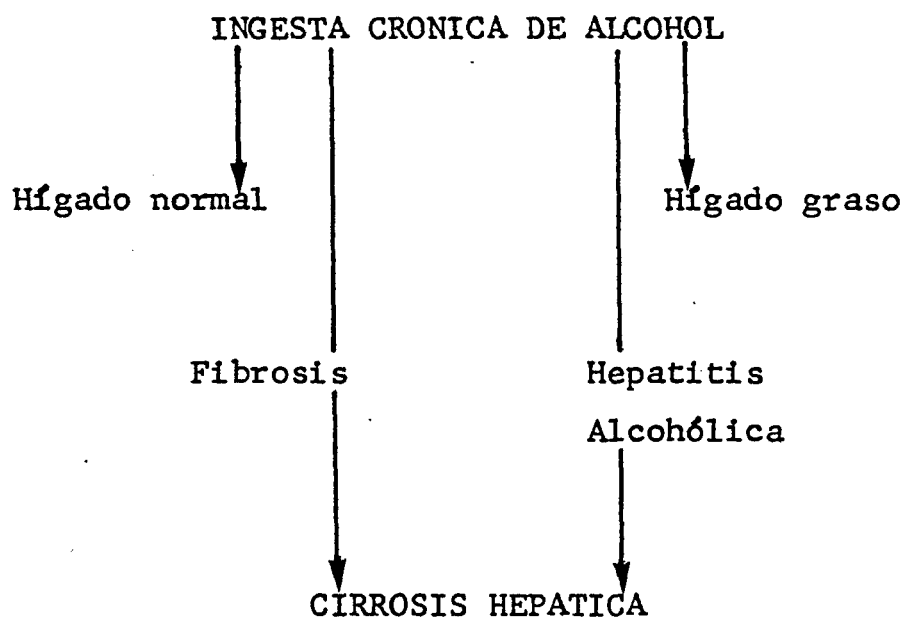


Figura 2.



### DIAGNOSTICO BIOLOGICO DEL ALCOHOLISMO.

El reconocimiento de una hepatopatía alcohólica, aún en fase tardía, tiene utilidad, pues es sabido que la supervivencia de esta enfermedad mejora si los pacientes dejan de beber alcohol. Mayor interés tiene, no obstante, diagnosticar la enfermedad en fases más tempranas.

Es conocida la existencia de ciertas anomalías bioquímicas que se encuentran presentes con mayor frecuencia en los pacientes alcohólicos. Algunas de ellas, conocidas como marcadores biológicos del alcoholismo, pueden sugerir al médico la existencia de un abuso en el consumo de bebidas alcohólicas, aún en ausencia de hepatopatía establecida. La gammaglutamiltranspeptidasa (GGT) se considera el principal marcador bioquímico del alcoholismo y numerosos estudios han demostrado su utilidad (28-29).

Su mecanismo de acción es a través del efecto estimulante que el alcohol tiene sobre las enzimas del retículo endoplásmico liso de los hepatocitos, fenómeno de inducción enzimática que también ocurre en pacientes tratados con sedantes, barbitúricos, hidantoínas y rifampicinas, etc. La GGT también se eleva de forma inespecífica

cuando existe cualquier tipo de hepatopatía. Excluidas estas posibilidades una elevación aislada de esta enzima se encuentra en un 60-80% de los individuos asintomáticos que consumen alcohol en cantidad excesiva y que no tienen evidencias clínicas ni bioquímicas de enfermedad hepática.

Otra anomalía bioquímica de utilidad en el diagnóstico del alcoholismo es el aumento del volumen corpuscular medio de los eritrocitos (VCM) por encima de 95 fl, que se aprecia en el 90% de los alcohólicos. En algunos casos se debe a un déficit de ácido fólico y suele asociarse con anemia. Sin embargo, en la mayoría de ocasiones se presenta sin anemia y no responde a la administración de ácido fólico. Se debe al efecto tóxico del alcohol o productos de su metabolismo sobre los eritroblastos (30).

La determinación simultánea de ambos parámetros, VCM yGGT, permite detectar un número superior de bebedores excesivos de cada método por separado y puede ser un método útil de despistaje del alcoholismo en grandes colectivos de personas asintomáticas.

Otras alteraciones analíticas que se asocian con el alcoholismo son la hiperuricemia y

la hipertrigliceridemia. Estas anomalías pueden también acompañar a otras enfermedades y su especificidad en el diagnóstico del alcoholismo es baja.

La alteración de otras pruebas hepáticas de laboratorio como por ejemplo la elevación de las transaminasas, presupone la existencia de una lesión hepática y por tanto no puede interpretarse como un criterio útil para el reconocimiento del alcoholismo. Sin embargo, si posee interés para el reconocimiento de la etiología alcohólica de una hepatopatía, cuando se encuentra un cociente GOT/GPT superior a dos, hecho inusual en las hepatopatías no alcohólicas.

Cuando un paciente alcohólico que presenta una elevación de los parámetros bioquímicos como VCM yGGT mantiene una abstinencia prolongada puede conseguir la normalización de los mismos. Así después de la supresión del alcohol la macrocitosis suele desaparecer en unas 12 semanas. La GGT suele regresar a valores normales entre dos y cuatro semanas de abstinencia, en los casos que no exista una lesión hepática. Si ésta ya existe sólo se conseguirá una reducción de los valores iniciales y en estos casos deben utili-

zarse otras pruebas como la determinación de alcohol en sangre u orina para poder asegurar la abstinencia del paciente, pues la anamnesis al propio paciente o a sus familiares no siempre es fiable.

### TRATAMIENTO DE LA HEPATOPATIA ALCOHOLICA

El tratamiento de la hepatopatía alcohólica es fundamentalmente sintomático y consiste en la supresión del alcohol, medidas destinadas a mejorar el estado nutritivo de los pacientes y tratar las complicaciones que aparecen en el curso de la enfermedad. En los últimos años se han introducido diversas terapéuticas supuestamente específicas cuya efectividad clínica no está, en la mayoría de casos, bien establecida.

La abstinencia de bebidas alcohólicas es suficiente para conseguir la desaparición de las lesiones en la esteatosis y suele mejorar la progresión de las lesiones histológicas, la supervivencia y la calidad de vida en la hepatitis alcohólica y en la cirrosis alcohólica.

En los pacientes con hepatitis alcohólica tanto el aporte nutritivo y vitamínico adecuados, como el tratamiento correcto de las infecciones y de otras complicaciones como encefalopatía, ascitis y hemorragia digestiva que acompañan con frecuencia esta enfermedad y finalmente la prevención y tratamiento del síndrome de abstinencia, suelen mejorar la supervivencia en la fase aguda de la enfermedad.

Dentro de los tratamientos supuestamente específicos el uso de los corticoides, basado en su acción antiinflamatoria e inmunológica, ha sido ampliamente difundido en el tratamiento de la hepatitis alcohólica sin que existan trabajos homogéneos que puedan asegurar su utilidad (31).

Existen otros ensayos terapéuticos que demuestran la disminución de la mortalidad y la mejoría clínica y bioquímica de los pacientes alcohólicos tratados con hipernutrición enteral o parenteral (32). El interés por este tipo de tratamiento se inició después de observarse la similitud del cuadro histológico de los pacientes con hepatitis alcohólica y aquellos sometidos a by-pass yeyuno-ileal tras conocer que existía en estos últimos pacientes una mejoría de las lesiones al ser sometidos a una dieta rica en aminoácidos administrados por vía enteral o parenteral.

El estado hipermetabólico que tienen los pacientes alcohólicos y el consiguiente mayor consumo de oxígeno, producen lesiones por hipoxia relativa en la zona peor oxigenada del hepatocito como es la zona centrolobulillar. Bajo esta hipótesis se han ensayado drogas antitiroideas (propiltiouracilo) en el tratamiento de la hepatitis

alcohólica con buenos resultados tanto en estudios experimentales en ratas alimentadas con alcohol como en un estudio controlado en humanos efectuado por Orrego et al (33). Estos efectos beneficiosos no han podido ser confirmados por otros autores (34).

El tratamiento con insulina y glucagón, factores hepatotróficos, ha sido sugerido como una posible arma terapéutica en las hepatopatías graves como la hepatitis alcohólica. Los estudios publicados hasta la actualidad son muy iniciales y no existen aún datos definitivos que puedan asegurar su utilidad.

Las alteraciones de la fibrogénesis con el consiguiente aumento del depósito de fibras de colágeno juegan un papel fundamental en la aparición y progresión de las lesiones hepáticas inducidas por el alcohol. Por este motivo se ha investigado la utilidad de medicamentos capaces de actuar sobre el metabolismo del colágeno ya sea disminuyendo su síntesis o aumentando su degradación. En esta línea se encuentran los ensayos realizados con D-penicilamina y colchicina.

Los estudios de Mezey et al (35) con D-penicilamina muestran una disminución de la acti-

vidad prolilhidroxilasa (enzima que interviene en la síntesis de colágeno). Otros efectos beneficiosos sobre la inhibición de la fibrogénesis en humanos no han sido referidos con esta droga.

Kershenobich et al (36) publicaron en 1979 el resultado inicial de un ensayo terapéutico con colchicina en 43 pacientes con cirrosis hepática tratados durante tres años con esta droga, en los que existía una mejoría de las pruebas hepáticas, disminución de la fibrosis y aumento de la supervivencia en comparación con el grupo control.

Podríamos pues concluir que no existe aún el tratamiento definitivo de la hepatopatía alcohólica. Este debe iniciarse con la abstinencia de bebidas alcohólicas y las medidas de carácter general descritas. Puede además ensayarse alguna de las terapéuticas más específicas siendo en la actualidad la hipernutrición y las drogas antifibrogenéticas las más prometedoras.



## B). F I B R O G E N E S I S H E P A T I C A

### NATURALEZA DEL TEJIDO CONJUNTIVO HEPATICO

La matriz del tejido conjuntivo intersticial hepático, está compuesta principalmente por proteínas del tipo colágeno. También se encuentran agua, sales y otros componentes cualitativamente menos importantes como son las glucoproteínas no colagénicas, los proteoglicanos y glucosaminoglicanos.

### COLAGENO

En el cuerpo humano hay por lo menos 7 tipos genéticamente distintos de colágeno. En el hígado existen 4 de estos tipos. Todas las moléculas de colágeno están formadas por tres cadenas polipeptídicas denominadas cadenas alfa que configuran una triple hélice. La molécula de colágeno puede contener un sólo tipo o dos tipos diferentes de cadenas alfa (tabla I). La proporción de cada uno de los diferentes tipos de colágeno es específica para cada tipo de tejido (37-47), aunque éstas proporciones cambian con el envejecimiento en el mismo tejido (48). Aunque cada tejido pueda contener hasta cuatro

T A B L A I

TIPOS DE COLAGENO EN TEJIDO CONJUNTIVO HEPATICO

<u>Tipos</u>	<u>Cadenas po- lipeptídicas</u>	<u>Fórmula molecular</u>	<u>Peso mo- lecular</u>
I	$\alpha_1$ (I)	$[\alpha_1(I)]_2 \alpha_2$	95.000
	$\alpha_2$		95.000
trimero I <sup>+</sup>	$\alpha_1$ (I)	$[\alpha_1(I)]_3$	95.000
III	$\alpha_1$ (III)	$[\alpha_1(III)]_3$	95.000
V o AB	$\begin{bmatrix} \alpha_A \\ \alpha_B \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} \alpha_A \\ \alpha_A \end{bmatrix}_3 \circ \begin{bmatrix} \alpha_B \\ \alpha_B \end{bmatrix}_3 \circ$	104.000
			99.000
IV	$\alpha_1$ (IV)	$[\alpha_1(IV)]_3$	140.000

+ Presente en pequeña cantidad; no se conoce su distribución en tejido hepático.

tipos distintos de colágeno, no hay evidencias de que tipos diferentes de colágeno polimericen en la misma fibra. La localización y la distribución en el hígado de los cuatro distintos tipos de colágeno ha podido ser conocida gracias a la obtención de anticuerpos monoespecíficos fluorescentes (49-52).

El colágeno tipo I corresponde a los haces gruesos de colágeno y forma el tejido conjuntivo denso del hígado (50,53). Se localiza preferentemente en los espacios porta y acompaña a los grandes vasos que penetran en el órgano.

El colágeno tipo III representa el estroma reticular del hígado (50,53). Está formado por fibras argirófilas que forman el armazón conjuntivo del tejido. Se organiza en haces delgados y se localiza en espacios porta, venas terminales y parénquima. En el parénquima se han identificado en el espacio de Disse; en contacto con las prolongaciones de la membrana plasmática de las células de Ito (54).

No todas las fibras reticulares del hígado son colágeno tipo III. Otros tipos de colágeno como el IV y V y glicoproteínas como la fibronectina se tiñen con plata. Ha sido sugerido

que la tinción argirófila de la fibra de colágeno tipo III, es debida a su asociación con fibronectina (55).

El colágeno tipo III forma haces delgados y se organiza en forma de tejido conjuntivo laxo. En cambio el colágeno tipo I se organiza en haces gruesos y forma el tejido conjuntivo denso. Esta organización de las fibras puede tener gran importancia si consideramos que su diferente estructura y organización puede determinar distintos grados de susceptibilidad de la proteína a la digestión por enzimas proteolíticas específicas denominadas colagenasas.

El colágeno tipo IV es típico de las membranas basales. Se encuentra alrededor de las células de musculo liso en los vasos sanguíneos, rodea conductos biliares, nervios, arteriolas hepáticas y conductos linfáticos. En el parénquima hepático se sitúa entre el revestimiento endotelial y las trabéculas de los hepatocitos (51).

El colágeno tipo V se encuentra en espacios porta y venas hepáticas terminales (50). Tiene además una localización perisinusoidal y en algunos sitios parece envolver a algunos he-

patocitos. Este colágeno es heterogéneo en cuanto a su composición en subunidades polipeptídicas. Tiene algunas semejanzas con la composición de los aminoácidos con el colágeno de la membrana basal.

### GLUCOPROTEINAS

En el tejido hepático a nivel intersticial se encuentran varias glucoproteínas aunque sólo dos de ellas han sido identificadas por medio de anticuerpos fluorescentes específicos. Estas proteínas son la laminina y la fibronectina (51).

La fibronectina es una proteína de elevado peso molecular formada por dos subunidades no idénticas de 220.000 daltons (56). Es la proteína mas abundante de la membrana plasmática de los fibroblastos y está disminuida o ausente en la membrana de los fibroblastos transformados. En el plasma hay una proteína similar a la fibronectina desde el punto de vista inmunológico, aunque aparentemente diferente en tamaño que se encuentra en una concentración de 30 mg/ml (57, 58). La fibronectina tiene varios sitios específicos en su estructura que son importantes en su función. Tiene zonas específicas de unión para células, glucosaminoglicanos, colágeno y glucoproteínas. Se ha demostrado que la fibronectina es un factor quimiotáctico para fibroblastos y participa en fenómenos de opsonización (58-59). En el hígado la fibronectina se encuentra distribuida en todos los lugares en donde

hay colágeno tipo IV, excepto en las regiones periportales (51). Se encuentra asociada a otros tipos de colágeno en el parénquima y alrededor de la vena terminal.

La laminina es otra glucoproteína formada por dos subunidades de peso molecular distinto (220.000-440.000 daltons) unidas por puentes disulfuro (57). Es inmunológicamente distinta a la fibronectina y tiene además un peso molecular y una composición de subunidades diferente (60). Se encuentra en las membranas basales de todos los tejidos y en el hígado se distribuye con el colágeno tipo IV, excepto en la zona sinusoidal en donde se encuentra fibronectina en vez de laminina. Esta proteína puede desempeñar un papel en la morfogénesis y puede ser una de las proteínas más importantes en el fenómeno de adhesión de las células epiteliales al colágeno, especialmente al colágeno tipo IV, circunstancia que favorecería la proliferación celular (61).

Existe otra glucoproteína de peso molecular elevado y cuya estructura se desconoce, que se ha extraído de la matriz conjuntiva del hígado asociada a otras proteínas, denominada hepatonectina que es inmunológicamente diferente

a la fibronectina aunque con una composición de aminoácidos parecida. En el hígado se localiza en los espacios porta delimitando la membrana limitante. Está presente alrededor de la vena terminal. En la región sinusoidal muestra un patrón semejante al observado en los colágenos tipo IV y V.



### PROTEOGLICANOS Y GLICOSAMINOGLICANOS

Los proteoglicanos forman la sustancia base del tejido conjuntivo y son importantes porque condicionan sus propiedades viscoelásticas. Los proteoglicanos están constituidos por unidades de polisacárido (95%) y de proteína (5%). Estos voluminosos polianiones retienen agua y cationes y así forman la sustancia base del tejido conjuntivo. Los glicosaminoglicanos son las cadenas polisacáridas de los proteoglicanos y están formados por unidades repetitivas de un disacárido que contiene un derivado amino-azúcar que es la glucosamina o la galactosamina (62-63). Por lo menos uno de los azúcares del disacárido tiene un grupo carboxilato o sulfato cargado negativamente. Los principales glicosaminoglicanos son el hialuronidato, condroitín-sulfato, keratán-sulfato, dermatán-sulfato, heparán-sulfato y heparina.

No se conoce la estructura de los proteoglicanos del hígado. Sin embargo la proporción de glicosaminoglicanos hepática si ha sido cuantificada resultando que en el hígado existe: 10% de ácido hialurónico, 7% de dermatán-sulfato, 7% de condroitín-sulfato y un 75% de heparán-sulfato

(64-65). Este último se encuentra en una concentración elevada debido a que es el glicosaminoglicano más abundante de la membrana plasmática de los hepatocitos y es sintetizado por hepatocitos (66) o líneas celulares derivadas de los mismos (67). La distribución precisa de los otros glicosaminoglicanos dentro del hígado no está claramente establecida.

## METABOLISMO DEL COLAGENO

### ESTRUCTURA DE LAS MOLECULAS DE COLAGENO

Como ya hemos comentado en un apartado anterior cada uno de los diferentes tipos de colágeno consta de tres cadenas alfa. Cada una de estas cadenas está sintetizada por un gen distinto y su secuencia de aminoácidos es diferente (40,68). Sin embargo hay mucha similitud entre ellas. Las cadenas alfa están formadas por la aposición de tripletes de aminoácidos de los que uno es la glicina y los otros dos son variables, ajustándose a la fórmula  $(\text{Gli-X-Y})_n$ . En los tejidos conectivos el número de tripletes (n) es aproximadamente de 334 y en el colágeno de la membrana basal es de aproximadamente 490. En la posición X se encuentra en la mayoría de los casos la prolina y en la posición Y se encuentra la hidroxiprolina y la hidroxilisina, dos aminoácidos que no abundan en la constitución de las otras proteínas del organismo (40,69). La secuencia glicina-prolina-hidroxiprolina se repite con frecuencia. Algunos residuos de la hidroxilisina sufren una glicosilación con galactosa o glucosa y galactosa (40,68). El número de unida-

des de carbohidrato incorporadas por unidad de procolágeno varía con los diferentes tipos de colágeno. La repetición del triplete Gli-X-Y es imprescindible para la formación de la triple hélice (70). El avance por residuo de esta hélice, distinta de la hélice alfa, es de 2,9 A y el número de residuos es de 3,3 por vuelta (71). Las tres cadenas se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno. Los dadores de hidrógeno son los grupos NH peptídicos de los residuos de glicina y los aceptores del hidrógeno los grupos CO peptídicos de los residuos de otras cadenas. La dirección del puente de hidrógeno es transversal respecto al eje de la fibrilla de colágeno. Los grupos hidroxílicos de los residuos de prolina y las moléculas de agua también participan en los enlaces de hidrógeno, estabilizando la triple hélice (72). La glicina es el único residuo que puede situarse en una posición interior (71). Los dos residuos de aminoácidos a cada lado de la glicina quedan situados en el exterior de la fibra, donde los anillos voluminosos de los residuos prolina e hidroxiprolina pueden acomodarse fácilmente. La glicina es el aminoácido más pequeño y su pequeño tamaño permite a las cadenas

alfa formar una triple hélice. Esta configuración de la triple hélice es necesaria para la secreción normal del colágeno y lo hace resistente al fraccionamiento por la acción de las proteasas de los tejidos excepto a la colagenasa (73). La triple hélice le confiere a la molécula de colágeno, dureza, resistencia a la tracción y esta configuración es esencial para la organización de las moléculas de colágeno en fibrillas (38,74). El depósito de moléculas de colágeno formando fibrillas y la presencia de hidroxiprolina en las moléculas son esenciales para la formación de enlaces intermoleculares y a su vez éstos aseguran la solidez de las fibrillas de colágeno (74-77). El desenrollamiento de la triple hélice provoca la desnaturalización del colágeno, que puede afectar a una parte o a la totalidad de la molécula de colágeno, quedando las zonas desnaturalizadas susceptibles de ser digeridas por hidrolasas ácidas y proteasas neutras (73,77). Cuando la temperatura de los tejidos es próxima a los 40° C los enlaces de hidrógeno y los puentes de agua que mantienen la estructura de la triple hélice se rompen, la hélice pierde su estructura, se desenrolla y que-

da apta para la digestión enzimática (72,78).

Las características estructurales que contribuyen a la formación y estabilización de las cadenas alfa de la triple hélice de colágeno son necesarias tanto para la síntesis , secreción y depósito del colágeno como para mantener el recambio de esta proteína en el tejido conjuntivo. La estructura primaria y terciaria del colágeno también juega un papel importante en la interacción de células con colágeno y su entorno, y su interacción con otras proteínas de la matriz extracelular (79).

### BIOSINTESIS DE LAS CADENAS DE PROCOLAGENO

En 1971 Lenaers et al (80) estudiando piel de ganado afecto de dermatosparaxis descubrieron el precursor de la cadena alfa del colágeno tipo I. Este descubrimiento fue seguido de otro más general por el que se sabe que todas las cadenas polipeptídicas del colágeno se sintetizan como grandes cadenas de procolágeno llamadas cadenas proalfa. Estas cadenas proalfa son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso (a nivel de los polisomas)(81).

Las cadenas proalfa constan de una región central formada por tripletes (Gli-X-Y) y dos extremos terminales, uno amino (N) y otro carboxi (C). En el extremo aminoterminal del procolágeno existe un pequeño segmento que tiene la estructura helicoidal del colágeno, pero la mayor parte del mismo y todo el extremo carboxiterminal están formados por cadenas lineales no colagénicas (69).

El peso molecular del extremo aminoterminal (N) es de 15.000 daltons y el del extremo carboxiterminal (C) es de 34.000 daltons. El peso molecular de una cadena proalfa es aproximadamente de 150.000 daltons y el de una molécula

de procolágeno de aproximadamente 450.000 daltons (68,82).

Más recientemente se sabe que las cadenas de procolágeno se sintetizan como preprocolágeno que tienen unos 100 aminoácidos en la parte inicial del extremo aminoterminal de las cadenas del procolágeno (83). Estos residuos sirven de guía para el inicio de la síntesis de las cadenas polipeptídicas dentro del retículo endoplásmico rugoso. Estas cadenas de preprocolágeno pasan rápidamente a cadenas proalfa (en el retículo endoplásmico rugoso) y permanecen así hasta que son secretadas al espacio extracelular (68,70,83).

#### TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN

Como en toda síntesis de proteínas la transcripción del mensaje genético del DNA al RNA mensajero (84), es el primer paso para la síntesis de cada cadena de preprocolágeno (tabla II). Cada tipo diferente de RNA mensajero traduce a nivel de los polisomas del retículo endoplásmico rugoso, una cadena polipeptídica diferente que pasará luego a la luz de esta organela. Así se determina la estructura primaria de la proteína, por lo que defectos en la transcripción o tra-



T A B L A II

SINTESIS DE COLAGENO

1. Transcripción de los genes para cada cadena de colágeno.
2. Traducción del RNA mensajero para cada cadena de colágeno.
3. Modificaciones postraduccionales.
  - a). Hidroxilación de la prolina y lisina en las cadenas preproalfa y proalfa (retículo endoplásmico rugoso).

Enzimas: 3 prolil-hidroxilasa, 4 prolil-hidroxilasa, lisil-hidroxilasa.

Cofactores: Oxígeno, ascorbato, ión ferroso, alfa-cetoglutarato.
  - b). Glicosilación de la hidroxilisina en las cadenas proalfa (retículo endoplásmico rugoso).

Enzimas: Galactosiltransferasa y glucosiltransferasa.

Cofactores:  $Mn^{++}$ .
  - c). Glicosilación de los péptidos terminales.

Enzimas: Glucosiltransferasa y manosiltransferasa.

Cofactores: Manosa, glucosamina, asparagina.
  - d). Formación de puentes disulfuro entre los ex-

tremos carboxiterminal de las tres cadenas pro-  
alfa.

e). Formación de la triple hélice.

f). Transporte de moléculas de colágeno al com-  
plejo de Golgi.

Requerimiento: Energía.

g). Secreción de las moléculas de procolágeno al  
espacio extracelular.

Requerimiento: Energía, microtúbulos íntegros.

h). Conversión de las moléculas de procolágeno en  
colágeno.

Enzimas: Procolágeno N-peptidasa y procoláge-  
no C-peptidasa.

Cofactores:  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ .

4. Unión de las moléculas de colágeno formando fibri-  
llas.

5. Formación de enlaces intramoleculares e intermole-  
culares.

Enzima: Lisiloxidasa.

Cofactor: Cobre.

ducción serán responsables de defectos en la secuencia primaria de los aminoácidos en las cadenas polipeptídicas del colágeno, que pueden ser teóricamente responsables de defectos hereditarios o adquiridos del colágeno.

#### MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

Mientras las cadenas alfa del preprocolágeno están aún unidas a los ribosomas empiezan ya dos de los ocho pasos postraduccionales (tabla II).

##### - Hidroxilación de los residuos de prolina y lisina.

La hidroxilación de los residuos de prolina y lisina empieza mientras estas cadenas de preprocolágeno están en la luz del retículo endoplásmico rugoso y se completa en las cadenas proalfa antes de que la triple hélice se forme en la luz del retículo endoplásmico rugoso (68, 83, 85, 86). De hecho estas hidroxilaciones finalizan cuando las cadenas polipeptídicas inician la formación de la triple hélice (fig. 3). Aquellas condiciones que faciliten o retrasen la formación de la triple hélice tales como cambios de temperatura o en la formación de puentes disul-

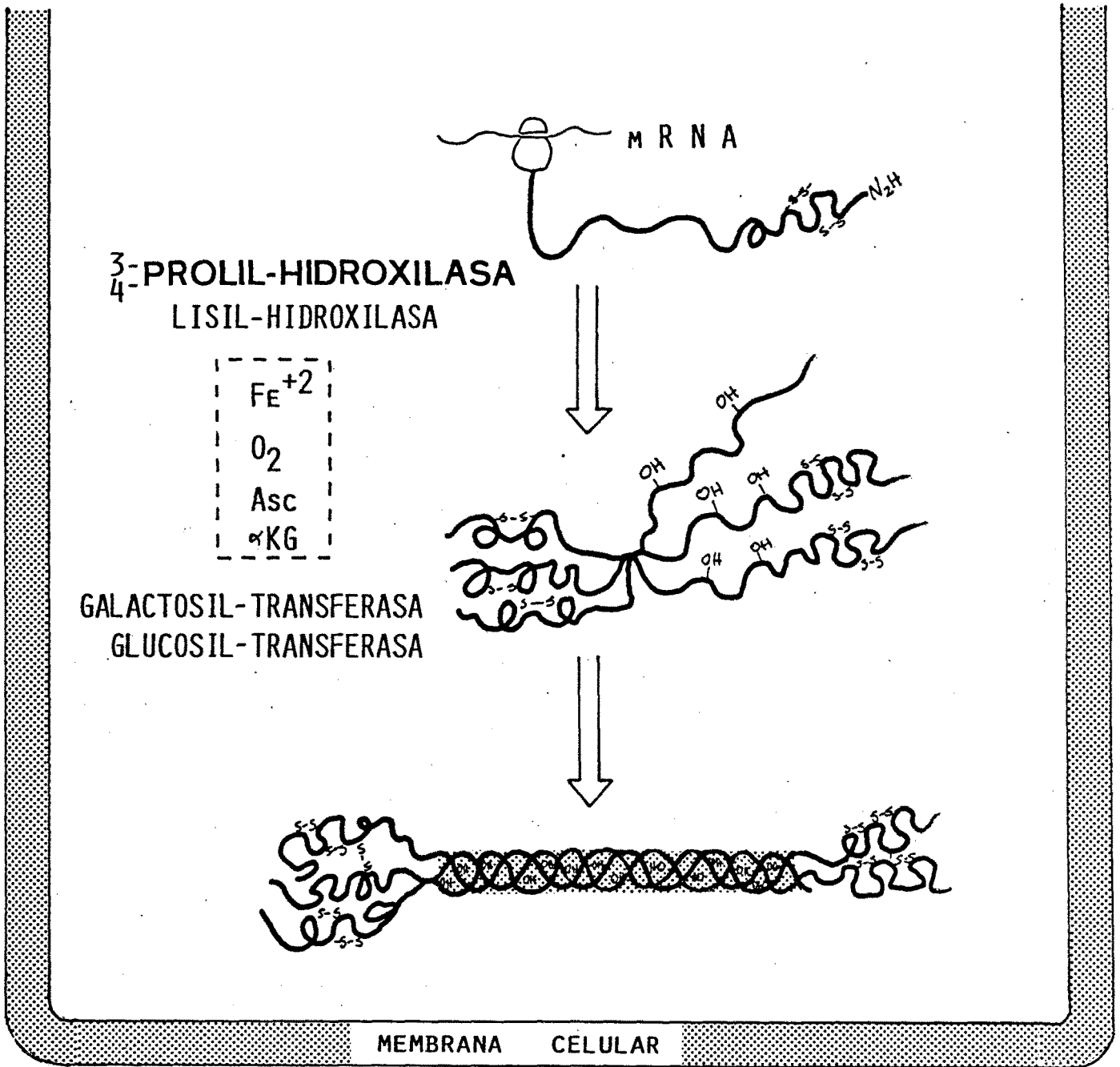


Figura 3. Biosntesis del colágeno. Modificaciones postraduccionales.

furo, pueden alterar la cantidad de hidroxiprolina e hidroxilisina en cada tipo de cadena polipeptídica (40, 85, 87). De forma similar deficiencias o defectos en los enzimas hidroxilantes o en sus cofactores o cosustratos provocarán deficiencias de hidroxiprolina e hidroxilisina, lo que comportará alteraciones en la secreción, formación de fibrillas, enlaces cruzados o degradación del colágeno (83, 85, 86, 88-90). Los defectos en las reacciones de hidroxilación son la base de varias enfermedades del colágeno tanto hereditarias como adquiridas.

Salvo pequeñas cantidades de hidroxiprolina que existen en la elastina (51), acetilcolinesterasa (92) y fracción C1q del complemento (93), la hidroxiprolina en los vertebrados sólo se encuentra en el colágeno. La hidroxiprolina e hidroxilisina no se incorporan a las cadenas polipeptídicas del colágeno por los mecanismos habituales de síntesis proteica. La hidroxiprolina en el organismo deriva de la hidroxilación de los residuos de prolina en la cadena polipeptídica recién formada y no es posible incorporar hidroxiprolina marcada a un colágeno sintetizado porque no existe en el organismo RNA de

transferencia para este aminoácido (69).

La hidroxilación de la prolina y lisina está catalizada por los enzimas 3-prolil-hidroxilasa, 4-prolil-hidroxilasa y lisil-hidroxilasa. Estas reacciones requieren oxígeno libre, ión ferroso, alfa-cetoglutarato y ácido ascórbico (69, 71, 94). La 3-prolil-hidroxilasa hidroxila el carbono 3 y la 4-prolil-hidroxilasa hidroxila el cuarto carbono del anillo de prolina. La 3-prolil-hidroxilasa sólo reconoce a la prolina en la porción X del triplete Gli-X-Y y la 4-prolil-hidroxilasa sólo reconoce a la prolina en posición Y (95, 96). Dado que la 4-hidroxiprolina predomina en todos los tipos de colágeno, cuando se habla de hidroxiprolina en general se piensa en ella. La 3-hidroxiprolina representa sin embargo aproximadamente el 10% del total de la hidroxiprolina en el procolágeno de la membrana basal (97, 98) y es probable que este aminoácido contribuya a una mayor estabilidad térmica del procolágeno de la membrana basal o a un aumento de resistencia a la acción de las colagenasas tisulares.

Cantidades adecuadas de 4-hidroxiprolina son necesarias para estabilizar la triple hélice

de colágeno a la temperatura corporal (72, 78). Cuando el contenido de 4-hidroxiprolina se reduce de forma notable por una hipoxia tisular o un déficit de vitamina C, el colágeno recién sintetizado se desnaturaliza y no forma la triple hélice. Ello produce un descenso en la secreción y depósito del colágeno y un incremento en la degradación del colágeno no hidroxilado que es secretado como proteína no funcionante y no será incorporado para formar fibras de colágeno (69).

Los residuos de hidroxilisina son precisos para la formación de enlaces intermoleculares que estabilicen las moléculas de colágeno en las fibras (75, 76, 99, 100). De forma similar a la 4-prolil-hidroxilasa, la lisil-hidroxilasa sólo reconoce a la lisina cuando ésta está situada en la posición Y del triplete Gli-X-Y (101). Asimismo la hidroxilisina de forma similar a la hidroxiprolina se encuentra casi únicamente en los tejidos de los vertebrados. Existe una variación en las cantidades de hidroxiprolina en los diferentes tipos de colágeno e incluso en los mismos tipos de colágeno en diferentes tejidos y según la edad del tejido en un mismo tejido (40, 76, 85, 88, 102, 103).

Los defectos de hidroxilación de la lisina deben ocurrir antes de que las cadenas de procolágeno formen la triple hélice en los ribosomas pero este déficit sólo se pone de manifiesto cuando las moléculas de procolágeno son secretadas, convertidas en colágeno y organizadas en fibras. La deficiencia de hidroxilisina provoca una deficiencia en las uniones cruzadas intermoleculares provocando una pérdida de resistencia a la tracción en las fibras de colágeno (76, 88, 100).

- Glicosilación de los residuos de hidroxilisina.

La glicosilación de la hidroxilisina es el tercer paso postraduccional que se produce en las cadenas proalfa (82, 83). Algunos de estos residuos son nuevamente glicosilados con glucosa (82, 85, 103). Estas reacciones son catalizadas por los enzimas galactosiltransferasa y glucosiltransferasa respectivamente, que requieren como cofactor  $Mn^{++}$ . Estos enzimas glicosilantes son específicos para residuos de hidroxilisina de las cadenas proalfa del colágeno antes de que adopte la conformación helicoidal. El número de unidades de carbohidrato incorporadas por unidad de procolágeno depende del tejido. Dado que la hidro-



xilisina es requerida como un aceptor para la glucosa o la galactosa, la glicosilación no puede tener lugar cuando la hidroxilación de la lisina está bloqueada. La formación de la triple hélice bloquea también esta reacción por lo que el número de glicosilaciones puede verse afectada por cambios en la velocidad de formación de la triple hélice. De hecho el tiempo transcurrido en la formación de la triple hélice y el número de glicosilaciones varía en cada tipo de colágeno. Un retraso en la formación de la triple hélice se manifiesta por un aumento del intervalo de tiempo entre la síntesis y la secreción de procolágeno que se acompaña asimismo de un aumento en el número de glicosilaciones de las cadenas proalfa (90, 103, 104).

- Glicosilación de los péptidos terminales y formación de puentes disulfuro.

Las cadenas no colagénicas del péptido carboxiterminal (C) de cada cadena proalfa se glicosilan en el retículo endoplásmico rugoso (105-106). Esta glicosilación es bastante diferente de la que se origina en el resto de la cadena proalfa del colágeno. Utiliza azúcares diferentes como la glucosamina y la manosa que se unen a la as

paragina a través de uniones N-glicosídicas (105). La incorporación de estos azúcares se bloquea por la tunicamicina (101) pero no se afecta por defectos en la hidroxilación de la lisina (106). No se conoce actualmente la función exacta de estos azúcares. Otro paso importante en el proceso de síntesis intracelular de las cadenas proalfa de colágeno es la formación de puentes disulfuro dentro de la cadena (107,108) y entre las cadenas proalfa (82,109,110).

Como en otras proteínas que contienen puentes disulfuro, no está claro si la formación de estas uniones requiere un mediador enzimático o si ocurren espontáneamente durante la síntesis.

Dado que los puentes disulfuro entre las cadenas están en el extremo carboxiterminal estas uniones no pueden formarse hasta que el proceso de traducción se haya completado. Evidencias indirectas indican que los puentes disulfuro no se forman hasta que el proceso de traducción se ha completado y quizás no se produzca hasta que las cadenas proalfa hayan sido liberadas de los ribosomas (87,111,112,113).

- Formación de la triple hélice.

La formación de la triple hélice ocurre en

la luz del retículo endoplásmico rugoso y el proceso se inicia cuando se han formado los puentes disulfuro entre los péptidos de los extremos carboxiterminales de las tres cadenas proalfa (87, 89). Se cree que los péptidos del extremo carboxiterminal sirven para el reconocimiento correcto de las diferentes cadenas proalfa que intervienen en la formación de cada uno de los tipos específicos de colágeno. Debido a que una misma célula puede sintetizar simultáneamente varios tipos de colágeno, elastina, proteoglicanos, fibronectina y otras glicoproteínas de la matriz extracelular, debe existir un método capaz de reconocer de forma específica los polipéptidos que son necesarios para la síntesis de cada proteína específica. El péptido carboxiterminal ayudaría al reconocimiento de las cadenas proalfa y su correcta asociación en grupos de tres para la síntesis de los diferentes tipos de colágeno.

Inicialmente se creyó que el extremo aminoterminal de las cadenas proalfa podría ser al igual que el extremo carboxiterminal una zona de reconocimiento de péptidos, pero los extremos aminoterminales poseen sólo puentes disulfuro dentro de su cadena y no entre las cadenas (82,

114). Aunque la ausencia de puentes disulfuro entre las cadenas proalfa no es un hecho excluyente, si al menos reduce la verosimilitud de que el extremo aminoterminal juegue un papel en el reconocimiento de las distintas cadenas proalfa.

- Secreción de las moléculas de procolágeno.

Inmediatamente que la triple hélice se forma, el procolágeno es trasladado del retículo endoplásmico rugoso al complejo de Golgi antes de abandonar la célula (81,115,116).

Durante el proceso de secreción las moléculas de procolágeno se alinean formando paquetes condensados en las vacuolas de Golgi (81). Dichas vacuolas son luego transportadas a la superficie de la célula donde el procolágeno es secretado mediante el proceso de exocitosis (81). Este proceso de transporte y secreción precisa de la indemnidad de los microtúbulos. La colchicina y la vinblastina despolimerizan los microtúbulos y por tanto estas drogas pueden alterar la secreción normal de colágeno (68,82,117,118).

Aproximadamente un tercio del colágeno que se sintetiza puede degradarse antes de su secreción (119). El significado de este hecho no es

bien conocido pero es probable que sea para evitar que moléculas deficientemente formadas sean secretadas de la célula. Incluiría defectos en la secuencia primaria, hidroxilación de los residuos de prolina, formación de los puentes disulfuro o combinaciones anormales entre las diferentes cadenas proalfa. La degradación intracelular podría ser un mecanismo que controlara la velocidad de secreción del procolágeno.

#### MODIFICACIONES EXTRACELULARES

##### - Conversión de las moléculas de procolágeno en colágeno y formación de fibrillas.

En el espacio extracelular el procolágeno se convierte en colágeno. Precisa para ello de las enzimas procolágeno-N-peptidasa y procolágeno-C-peptidasa que escindirán de forma independiente los extremos aminoterminal y carboxiterminal respectivamente, de la molécula de colágeno, requiriéndose como cofactor el  $\text{Ca}^{++}$  (120, 122) (fig. 4). Las moléculas de procolágeno que son solubles, difunden hacia donde están localizadas estas enzimas que escinden los extremos de la molécula de procolágeno y la convierten en colágeno (40,82,89). Las moléculas de colágeno

# BIOSINTESIS DEL COLAGENO

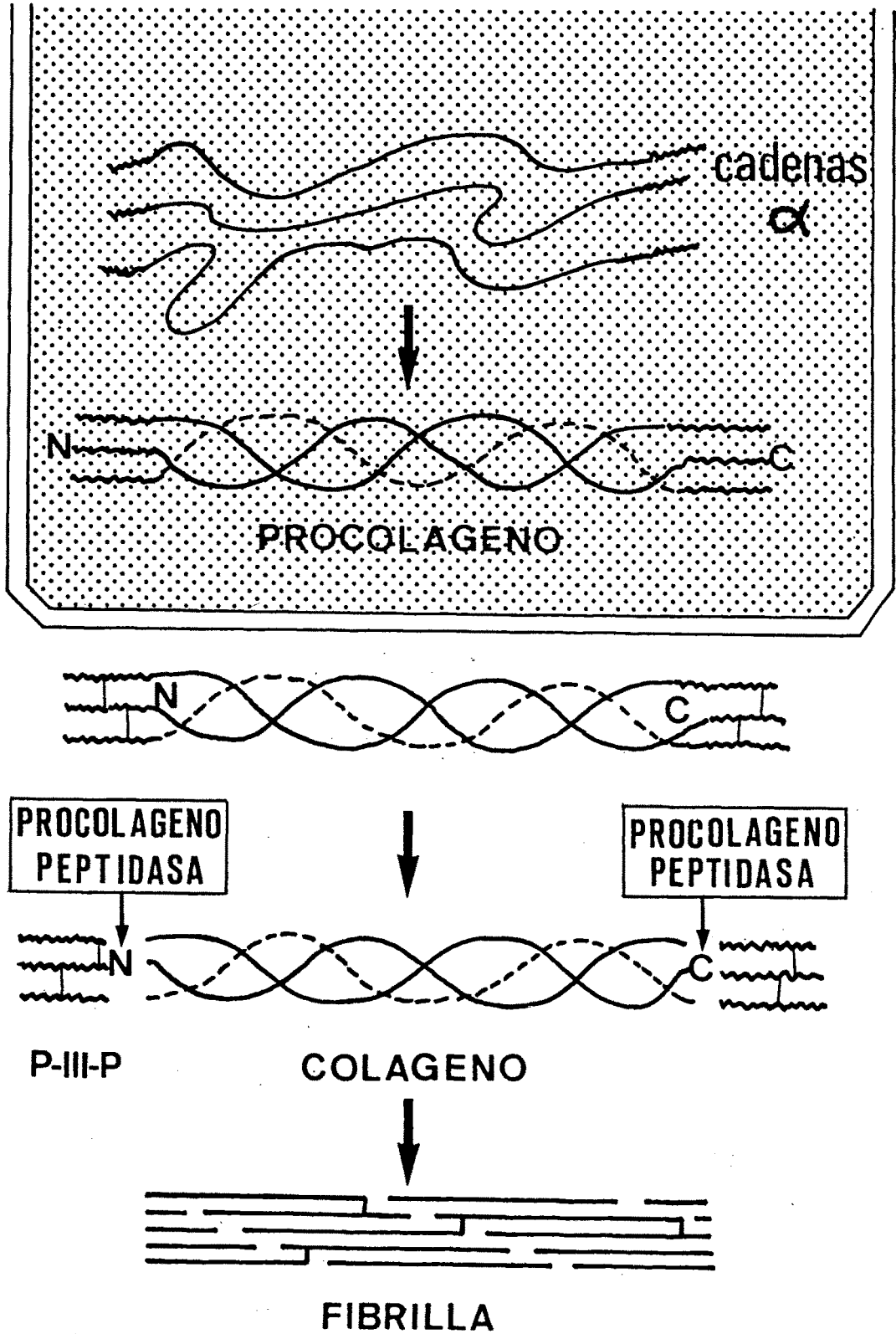


Figura 4. Biosíntesis del colágeno. Modificaciones extracelulares.

se agrupan espontáneamente para formar fibrillas de colágeno insolubles en el espacio extracelular precisando para ello una concentración fisiológica de sales e iones.

Los lugares y mecanismos de depósito de los diferentes tipos de colágeno en el espacio extracelular tienen características diferentes en cada tipo de colágeno, pero no se conocen los mecanismos que sirven de control a la formación de las fibrillas de colágeno. Estudios recientes muestran sin embargo que algunas de las enfermedades primarias del colágeno incluyen defectos en el crecimiento de las fibrillas de colágeno (123,124).

La geometría total de la fibrilla de colágeno se ha deducido a partir de estudios de rayos X y de microscopía electrónica. Las fibrillas de colágeno presentan estriaciones cruzadas cada 680 A; sin embargo la longitud de cada molécula de colágeno es de 3000 A (71). Un periodo en la fibrilla varias veces menor que la longitud de las moléculas constituyentes, indica que las moléculas de colágeno en filas adyacentes no pueden comenzar a la vez. Las filas adyacentes de colágeno quedan desplazadas aproximadamente un

cuarto de su longitud de la molécula de colágeno (71). El diseño estructural fundamental de la fibrilla de colágeno es pues el de una formación escalonada de moléculas de colágeno donde cada escalón está desplazado un cuarto de la longitud de la molécula de colágeno. Las moléculas de colágeno no están conectadas por sus extremos. Existe una brecha de cerca de 400 A entre el final de una molécula de colágeno y el comienzo de la otra.

Esta organización tiene una importancia estructural para el establecimiento de enlaces cruzados intermoleculares que se sitúan de forma que resulte una fibrilla mas tensa.

- Formación de enlaces intra e intermoleculares

Una vez producida la escisión de los extremos del procolágeno existe la aposición espontánea de moléculas de colágeno en fibrillas que son microscópicamente indistinguibles del colágeno maduro. Las fibrillas inmaduras se diferencian de las maduras en la falta de enlaces cruzados, que les resta resistencia a la tracción.

Se forman dos tipos de enlaces cruzados en las fibrillas de colágeno: unos intramoleculares y otros intermoleculares (76,125,126,127). Los



enlaces intramoleculares del colágeno derivan de las cadenas laterales de lisina o hidroxilisina. El primer paso consiste en la conversión del grupo  $\epsilon$  amino de la lisina o hidroxilisina en un aldehído (71,76,128). Dos de estos aldehídos sufren entonces una condensación, un ión enolato derivado de un aldehído se adiciona al grupo carbonílico de otro aldehído (71,76,128).

El enlace cruzado aldólico puede reaccionar con la cadena lateral de la histidina para formar un enlace cruzado de aldol-histidina.

El grupo aldehído en el enlace cruzado de aldol-histidina aún puede formar una base de Schiff con otra cadena lateral, como la hidroxilisina o lisina (71,76,128,129). De esta manera cuatro cadenas laterales pueden quedar covalentemente enlazadas una a otra. Algunos de estos enlaces cruzados pueden producirse entre cadenas laterales de diferentes moléculas de colágeno. Las bases de Schiff así formadas son la mayor fuente de enlaces cruzados intermoleculares. Se acepta, que si el grupo aldehído de la base inicial de Schiff deriva de la hidroxilisina, el enlace cruzado es más estable que si el aldehído se forma de la lisina (99,130,131).

La enzima lisil-oxidasa (132-134) es la encargada de catalizar la deaminación oxidativa de los grupos lisina e hidroxilisina y de la formación de aldehídos que más arriba hemos descrito. Es una enzima extracelular y requiere cobre como cofactor. Esta reacción enzimática deja de producirse tanto si existe un déficit de la enzima lisil-oxidasa, déficit de cobre, hipoxia tisular, drogas como la penicilamina que se unen a los aldehídos o sustancias como el  $\beta$ -amino-propionitrilo que se une de forma irreversible con esta enzima (76,128). La importancia de los enlaces cruzados es la de conferir fortaleza mecánica a las fibrillas de colágeno y por el contrario el déficit de estos enlaces cruzados da como resultado un colágeno frágil.

- Formación de fibras de colágeno.

Durante el proceso de crecimiento y maduración del tejido conectivo se produce un aumento del diámetro de las fibrillas de colágeno. Este diámetro es probablemente tejido específico y tipo de colágeno específico, pero se desconocen los mecanismos de crecimiento tanto laterales como lineales de estas fibrillas. Es posible que los componentes no colagénicos de la ma-

triz del tejido conjuntivo ejerzan un control en el crecimiento de las fibrillas de colágeno. De hecho las fibrillas de colágeno están completamente rodeadas por una capa de material no colagénico (glicoproteínas y proteoglicanos) que pueden influir en el crecimiento de la fibrilla (124). La capa de material polianiónico que rodea cada fibra de colágeno es posible que juegue un papel en el agrupamiento de las fibrillas en fibras y en la interacción de las superficies celulares con las fibras de colágeno (124). Las fuerzas de fricción y las interacciones entre el colágeno y el material no colagénico pueden también jugar un papel crítico en determinar la fuerza de tracción de las fibras de colágeno en el tejido conjuntivo (124,135,136).

### DEGRADACION DEL COLAGENO

Las colagenasas son unas enzimas que degradan específicamente el colágeno (73,77). Las colagenasas rompen enlaces peptídicos localizados en las regiones helicoidales características del colágeno. Las moléculas de colágeno son muy resistentes al ataque por otros enzimas hidrolíticos. Se conocen dos tipos de colagenasas. El primero de ellos engloba a las colagenasas tisulares que se han encontrado en los tejidos de anfibios y mamíferos sometidos a crecimiento. Esta actividad enzimática fue primeramente demostrada en la cola de renacuajos en fase de metamorfosis (137). En pocos días se reabsorben en este tejido grandes cantidades de colágeno. La actividad colagenolítica se ensayó cultivando pequeños fragmentos de cola en metamorfosis sobre una capa de colágeno fibroso que es opaca. La formación de una zona clara a las pocas horas reveló la presencia de una concentración elevada de colagenasa (137). Una elevada actividad enzimática se ha encontrado también en tejidos de mamíferos sometidos a una reorganización rápida, como ocurre en el útero después del parto.

La rotura completa del colágeno requiere

un número de pasos enzimáticos, aunque las colagenasas tisulares solo producen una rotura de cada cadena alfa en la triple hélice de la molécula de colágeno. La rotura de la molécula de colágeno por las colagenasas tisulares se produce a nivel del aminoácido 750 en una secuencia de 1000 aminoácidos (73,77). Es decir que estas enzimas rompen las tres cadenas de la molécula de colágeno en dos fragmentos de tres cuartos y un cuarto de su longitud respectivamente. Esta simple rotura provoca un desenrollamiento y desnaturalización de la molécula de colágeno a la temperatura del organismo. Este colágeno desnaturalizado es susceptible de ser atacado por peptidasas tejido específicas convirtiéndose en pequeños péptidos o aminoácidos libres. Estos dos pasos en el proceso degradativo ocurren con todas las colagenasas de los mamíferos pero existen diferencias de susceptibilidad de los diferentes tipos de colágeno a las diferentes colagenasas. Así por ejemplo la colagenasa del granulocito en el pulmón rompe antes el colágeno tipo I que el tipo III (138).

El segundo tipo de colagenasas incluye aquellas que son sintetizadas por ciertos microorga-

nismos (73). Su forma de actuación es muy diferente a la de las colagenasas tisulares ya que a diferencia de estas últimas, las colagenasas bacterianas actúan a nivel de toda la molécula de colágeno efectuando múltiples roturas y reduciendo la molécula a tripletes Gli-X-Y.

De esta forma actúa la colagenasa que segrega el Clostridium histolyticum, bacteria que produce la gangrena gaseosa, que favorece la diseminación de la infección al destruir las barreras de tejido conjuntivo del huesped. Estas bacterias no son afectadas por la enzima ya que no poseen colágeno.

### REGULACION DEL METABOLISMO DEL COLAGENO.

En la actualidad se sabe poco acerca de la regulación de la síntesis, secreción, depósito y recambio del colágeno en el tejido conjuntivo. Se sabe que cambios en las células de su alrededor pueden representar cambios en los tipos de colágeno sintetizado y que simples cambios como un incremento en los iones  $K^+$  pueden conducir a un incremento en la proliferación celular y en la síntesis de la matriz extracelular (139).

El mecanismo exacto de la estimulación de la respuesta fibrogénica se desconoce; sin embargo, hay datos experimentales que sugieren que los macrófagos desempeñan un papel preponderante en el proceso. Los agentes etiológicos directamente, o por sustancias liberadas por las células dañadas, son capaces de producir una serie de compuestos químicos de diversa naturaleza, tales como prostaglandinas o fibronectina, que estimulan la producción de colágeno. Las prostaglandinas estimulan la producción de adenilciclasa produciendo un aumento del AMP cíclico celular y un aumento de la degradación intracelular de colágeno que comporta una disminución de la síntesis (140, 141). Este incremento produce

cambios importantes en el metabolismo del tejido conjuntivo en general (141,142) y del glucógeno hepático en particular. Por otra parte, se ha encontrado que la glucoproteína llamada fibronectina es un agente quimiotáctico que puede dirigir la llegada de fibroblastos al sitio de la lesión (143). El cambio en los elementos celulares (aumento de fibroblastos y células inflamatorias), así como la modificación en la matriz extracelular producida localmente, pueden estimular la producción de tejido conjuntivo cicatricial (144).

No existen todavía estudios que puedan concretar como se ejerce el control de todas las etapas de síntesis intracelular y extracelular del colágeno y de las enzimas que intervienen, necesarias para el depósito, estabilización y degradación del colágeno en el tejido conectivo.



### FUNCIONES DEL COLÁGENO EN EL TEJIDO CONJUNTIVO.

El papel más importante del colágeno en el organismo es proveer de una fuerza de tracción necesaria para mantener todos los tejidos unidos. Este papel es muy aparente en el tejido conectivo denso de los ligamentos y tendones, pero es igualmente importante en los órganos sólidos como el hígado, riñón o pulmón. Esta fuerza de tracción le es conferida por la existencia de enlaces cruzados intermoleculares, las fuerzas de fricción existentes entre fibrillas y fibras de colágeno y por las interacciones físicas o químicas del colágeno con otras estructuras del armazón extracelular (145).

La segunda característica funcional del colágeno en el tejido conjuntivo, es que las fibrillas y fibras se dispongan de forma que permitan a los tejidos plegarse o distenderse. Las moléculas, fibrillas o fibras de colágeno, individualmente son inextensibles (124). Un tejido solo puede ser distendido si todas las fibras y fibrillas son traccionadas en la dirección de las líneas de tensión. Si la fuerza de extensión excede la resistencia a la tracción, sobreviene la rotura.

Otra función de las fibras de colágeno es

limitar el movimiento de otros componentes del tejido conjuntivo. Así en el cartílago las fibras forman un entramado que atrapa agregados de proteoglicanos y una gran cantidad de fluidos (146). Este entramado limita el movimiento de los proteoglicanos. Cuando las fibrillas de colágeno se rompen o degradan, los proteoglicanos y los fluidos se movilizan y se pierde así la estructura del tejido.

El colágeno sirve también para inducir la agregación plaquetaria y en la formación del coágulo. Al mismo tiempo las fibrillas y fibras de colágeno inmovilizan al coágulo y limitan el movimiento de sustancias desde un foco inflamatorio.

Es probable que el colágeno de membrana basal sirva como un soporte estable y que limite la movilidad de las glicoproteínas más lábiles de la membrana basal (147). El colágeno de la membrana basal se une por puentes disulfuro a glicoproteínas de la matriz extracelular (103). Esta organización contribuye a que las membranas basales actúen como filtros mecánicos e iónicos y como sustrato para el soporte y separación celular. Muy poco se sabe acerca de la organización estructural de los constituyentes de la membra-

na basal; se sabe que el recambio del colágeno es mas lento que el de las glicoproteinas no colagénicas, y que además el colágeno de la membrana basal es resistente a la digestión de las colagenasas (148). Este hecho puede explicar porque las membranas basales acumulan a su alrededor capilares en regeneración como ocurre en la diabetes Mellitus (149).

Otra función del colágeno a nivel óseo es la de servir de sustrato para el depósito de cristales de hidroxapatita. El depósito y recambio del colágeno a nivel óseo regula el crecimiento, remodelación y reparación del hueso.

Durante el desarrollo embrionario el colágeno juega un papel clave en la regulación de la diferenciación celular (150,151) a nivel vertebral (152), corneal (150) y muscular (94).

### ENFERMEDADES METABOLICAS DEL COLAGENO.

Pueden sobrevenir trastornos específicos del metabolismo del colágeno en diferentes etapas de la síntesis de éste por enfermedades tanto de tipo hereditario como adquiridas (94,153).

### ENFERMEDADES DEL COLAGENO HEREDITARIAS

Dado que la función principal del colágeno es conferir a los tejidos resistencia a la tracción y distensibilidad, no es sorprendente que la fragilidad tisular o la hiperextensibilidad sean las causas de muchas alteraciones hereditarias del colágeno (tabla III).

Estas alteraciones incluyen el síndrome de Ehlers-Danlos (149,154,155) que se caracteriza por una hiperlaxitud cutánea y ligamentosa. Se distinguen varios tipos dentro de estas afecciones en función del trastorno específico de la síntesis de colágeno. En el tipo IV existe un déficit absoluto o relativo de colágeno tipo III que se encuentra en grandes arterias, tracto gastrointestinal y en la piel (89,126). Este déficit es el responsable de una fragilidad cutánea, intestinal y vascular que puede provocar la muerte súbita por rotura intestinal o de un vaso de grue-

T A B L A    I I I

ENFERMEDADES DEL COLAGENO HEREDITARIAS

- Dermatosparaxis.
- Formas dominantes y recesivas del síndrome de Ehlers-Danlos.
- Síndrome de Ehlers-Danlos tipos IV, V, VI, VII.
- Deficiencia de lisil-oxidasa en el ratón.
- Cutis laxa.
- Homocistinuria.
- Formas dominantes y recesivas de la osteogénesis imperfecta.
- Síndrome de Marfan.

so calibre.

En el tipo V existe un déficit de la enzima lisil-oxidasa que interviene en la formación de los enlaces intermoleculares. La consecuencia es una fragilidad e hiperextensibilidad de la piel, hipermotilidad articular y perturbación de los procesos de cicatrización (156).

En el tipo VI existe un déficit en la enzima lisil-hidroxilasa (157,158), que provoca una deficiencia en la hidroxilación de los residuos de lisina, con una disminución de residuos de hidroxilisina, en la nueva molécula de colágeno sintetizado, necesarios para establecer los enlaces cruzados intermoleculares y fibrillas maduras. Los pacientes carentes de esta enzima presentan escoliosis graves, luxaciones recidivantes e hiperlaxitud cutánea y ligamentosa.

El tipo VII se caracteriza por el déficit de la procolágeno-N-peptidasa, enzima encargada de la escisión de los péptidos terminales del extremo amino de la molécula de procolágeno. Las moléculas que se constituyen no presentan el tamaño normal sino que son de talla intermedia entre las moléculas de procolágeno y colágeno y presentarán dificultades para establecer los en-

laces cruzados. La sintomatología clínica es similar a la del tipo VI (159).

La dermatosparaxis es una afección que se da en ovinos y bovinos consanguíneos (160-163) y se debe a la misma alteración enzimática descrita en el síndrome de Ehlers-Danlos tipo VII.

El colágeno de la piel de estos animales está constituido por moléculas de procolágeno en las que el extremo aminoterminal no ha sido escindido. Se forman fibrillas y fibras de colágeno frágiles e irregulares. En la mayoría de los casos los animales mueren rápidamente como consecuencia de importantes desgarros cutáneos provocados por traumatismos incluso mínimos.

En la osteogénesis imperfecta existe un déficit relativo o absoluto de la síntesis de colágeno tipo I que sería el responsable de esta afección genética, de la que existen varios tipos (89). Se acompaña siempre de fragilidad ósea y frecuentemente de hiperlaxitud cutánea y articular.

Se piensa que el responsable de la enfermedad de Marfan, afección hereditaria de transmisión autosómica y de incidencia variable, sería una anomalía de los enlaces transversales

intermoleculares de las moléculas de colágeno. Las manifestaciones clínicas principales son: longitud excesiva de los huesos de las extremidades (con aracnodactilia), hiperlaxitud ligamentosa, luxación del cristalino, miopía, escoliosis, tórax excavado, y un número importante de malformaciones cardiovasculares que incluyen el aneurisma disecante de aorta y la insuficiencia valvular aórtica (89,149).

La homocistinuria es una enfermedad autosómica de tipo recesivo debida a un defecto en la formación de enlaces cruzados en las moléculas de colágeno y elastina por un déficit enzimático (164). En la homocistinuria existe un déficit de cistationina sintasa en el hígado y riñón que provoca un acúmulo de metionina, serina y homocistina en los tejidos y la excreción urinaria de homocistina (164). Uno de estos metabolitos bloquea los grupos aldehído que formarían enlaces intermoleculares, impidiendo la síntesis de un colágeno y elastina maduros. Estas alteraciones se traducen clínicamente con una alta incidencia de aneurismas de aorta y trombosis.

Las formas de cutis laxa en el hombre se caracterizan por una piel péndula, redundante,



hiperextensible aunque no elástica y enfisema pulmonar. Estas características de la piel la distinguen del síndrome de Ehlers-Danlos. En todas sus formas el exámen histológico de la piel, pulmones y grandes arterias muestran una deficiencia y fragmentación de las fibras elásticas y una acumulación de glicosaminoglicanos. Las fibras de colágeno son aparentemente normales. El déficit metabólico en esta enfermedad se ha relacionado con diferencias de la enzima lisiloxidasa (89,165) y/o déficits de cobre, que conducirían a un defecto en la formación de enlaces intermoleculares en el colágeno y en la elastina.

#### ENFERMEDADES DEL COLAGENO ADQUIRIDAS.

En la mayoría de las enfermedades adquiridas la respuesta fibrogénica suele ser localizada en contraste con la respuesta generalizada que se observa en las enfermedades hereditarias. Esta respuesta localizada generalmente incluye la estimulación de los fibroblastos y de la matriz extracelular. La respuesta al daño tisular implica cambios en los cocientes y en los tipos de colágeno sintetizado (166) (tabla IV).

T A B L A IV

ENFERMEDADES DEL COLAGENO ADQUIRIDAS.

I. CAMBIOS EN LA SINTESIS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE COLAGENO A NIVEL DE LA TRANSCRIPCION Y LA TRADUCCION.

A). Cambios como respuesta a la necrosis e inflamación celular.

1). Reparación de tejidos fibrosos.

- Formación de cicatrices.
- Formación de cicatrices hipertróficas.
- Contractura de Dupuytren.

2). Reparación de huesos y articulaciones.

- Osteoartritis.
- Artritis reumatoide.

3). Reparación parenquimatosa de órganos.

- Fibrosis pulmonar.
- Cirrosis.

4). Arterioesclerosis.

B). Cambios relacionados con la edad.

C). Cambios en las neoplasias.

II. CAMBIOS EN LA SINTESIS GENERAL DE CANTIDADES

DE COLÁGENO A NIVEL DE LA TRANSCRIPCIÓN, TRADUCCIÓN Y/O MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES.

A). Síntesis exagerada de colágeno.

- 1). Respuesta al insulto celular.
  - Reparación del tejido fibroso.
  - Reparación del tejido parenquimatoso de órganos (fibrosis pulmonar, cirrosis, glomeruloesclerosis).
  - Diabetes Mellitus.
- 2). Formación de cicatrices hipertróficas.
- 3). Neoplasias.
- 4). Osteoporosis.
- 5). Esclerodermia.

B). Deficiencia en la síntesis de colágeno.

- 1). Deficiencias nutricionales (hipovitaminosis C, déficit de zinc).
- 2). Glucocorticoides.
- 3). Prostaglandinas.
- 4). Infección vírica.

III. CAMBIOS A NIVEL DE LA HIDROXILACIÓN DE LA PROLINA Y LISINA.

A). Disminución en la hidroxilación.

- 1). Hipovitaminosis C (escorbuto).
  - 2). Hipoxia.
  - 3). Envejecimiento.
  - 4). Exceso de glucocorticoides.
- B). Aumento de la hidroxilación de la lisina.
- 1). Cicatriz hipertrófica o queloide.
  - 2). Esclerodermia.

#### IV. CAMBIOS EN LA FORMACION DE ENLACES CRUZADOS.

- A). Aumento de los enlaces intermoleculares.
- 1). Cicatrices hipertróficas.
  - 2). Esclerodermia.
  - 3). Cirrosis.
  - 4). Virus que inducen osteopetrosis.
- B). Deficiencia de los enlaces intermoleculares.
- 1). Latirismo.
  - 2). Deficiencia de cobre.
  - 3). Deficiencia de zinc.
  - 4). Deficiencia de hidroxilisina.
  - 5). Toxicidad por penicilamina.
- C). Defecto en la maduración de las fibrillas.  
(Esclerodermia).

#### V. DEFECTOS EN LA DEGRADACIÓN DEL COLAGENO.

A). Aumento de la degradación.

1). Aumento de la actividad colagenasa.

- Inflamación aguda.
- Infección bacteriana.
- Tumor invasivo.

2). Aumento de la susceptibilidad del colágeno.

- Desnaturalización del colágeno (hipertermia, disminución de la hidroxilación de la prolina).

B). Disminución de la degradación.

1). Disminución de la actividad colagenasa.

- Cirrosis.
- Esclerodermia.
- Osteopetrosis.

2). Disminución de la susceptibilidad del colágeno.

- Diabetes Mellitus.
- Cicatrices hipertróficas.

Sin embargo se sabe poco acerca de los mecanismos que regulan este proceso celular. No se sabe ni siquiera si el principal lugar de control es a nivel de transcripción, traducción o en uno de los pasos postraduccionales de la biosíntesis del colágeno.

En el animal una lesión tisular se sigue en general de un proceso de separación que incluye primero la invasión de la zona lesionada por los fibroblastos y después un depósito de colágeno. En la rata es excepcional que una lesión cutánea o hepática deje una cicatriz o una fibrosis permanente. Suele existir una restitución total. En el hombre en cambio es frecuente la formación de cicatrices y fibrosis permanentes que pueden conducir en algunas personas a la constitución de queloides. El proceso de cicatrización es casi siempre excesivo en el individuo normal. La constitución de una reacción fibrosa a raíz de un traumatismo es un fenómeno general, así en la arterioesclerosis se desarrolla a nivel de las paredes vasculares una fibrosis constituida por un depósito excesivo de colágeno.

La esclerodermia es una de las formas más

graves dentro de las afecciones secundarias a un trastorno adquirido del colágeno (166-168). Esta enfermedad se caracteriza por la acumulación de depósitos excesivos de colágeno en los tejidos. El trastorno consiste en un incremento de la síntesis y de los depósitos de colágeno que conduce a una proliferación "maligna" de las fibras de colágeno. En esta afección no genética, la alteración del mecanismo de regulación de la síntesis del colágeno no sería secundaria a un trastorno primitivo de éste, sino que obedecería a otra causa (presencia de un virus lento, respuesta autoinmunitaria anormal). La enfermedad comienza progresivamente; afecta primero la piel a nivel de las manos y se extiende a continuación al tejido subcutáneo y a los diferentes órganos principalmente el corazón, los pulmones y los riñones. La evolución suele ser fatal.

El escorbuto es una enfermedad adquirida secundaria a un déficit de ácido ascórbico, que es indispensable para la síntesis de hidroxiprolina (169). La carencia de este aminoácido necesario para la formación de la triple hélice viene a alterar pues la síntesis de fibras de colá-

geno (69). El síntoma clínico más importante es una deficiencia de los procesos de cicatrización por déficit de colágeno.



C). F I B R O S I S H E P A T I C A A L C O -  
H O L I C A.

NATURALEZA DE LA CICATRIZ EN LA CIRROSIS HEPATICA.

En la cirrosis hepática, los diversos componentes que forman el tejido conjuntivo están aumentados y su distribución está alterada. El colágeno contenido en el hígado cirrótico es unas 7 veces superior al de un hígado normal. En hígados cirróticos con moderada cantidad de colágeno, menos de 20 mg. de colágeno por gramo de tejido fresco, la relación del colágeno tipo I y tipo III es similar a la del hígado normal (1:1) (170,171). Sin embargo en los hígados cirróticos con más de 20 mg. de colágeno/g. de tejido fresco, predomina el tipo I y la relación I/III es mayor de 1 (2:1) (170,171). El aumento de colágeno tipo I hace que predomine el tejido conjuntivo denso y posiblemente la degradación por la colagenasa sea deficiente. Se ha sugerido que la presencia de más de 20 mg. de colágeno por g. de hígado y el aumento en la relación I/III determinan el estadio de irreversibilidad del proceso (172). En la cirrosis se ha observado por inmunofluorescencia que todos los

tipos de colágeno se encuentran presentes y entremezclados formando la cicatriz conjuntiva que rodea los nódulos de regeneración (49,51,52).

Los glicosaminoglicanos también se encuentran alterados en los hígados cirróticos, si bien no existe acuerdo entre distintos autores sobre la variación de las proporciones de los distintos glicosaminoglicanos (64,173,174). Tampoco está establecido si los cambios son únicamente cuantitativos o existen diferencias cualitativas.

Las glucoproteínas no colagénicas, laminina y fibronectina también están aumentadas y especialmente en la zona correspondiente al sinusoides, aparece laminina (51,175). La presencia de membranas basales o capilarización del sinusoides (176,177) podría ser debido a la presencia de laminina y fibronectina unidas a colágeno tipo IV.

La naturaleza de la cicatriz es la misma en todos los tipos de cirrosis, independiente del agente etiológico (170).

CELULAS INVOLUCRADAS EN LA SINTESIS DE COLAGENO.

En cultivo de tejidos, todos los tipos de células hepáticas son capaces de sintetizar colágeno (178). Esto indica que tanto los fibroblastos (179,180), los mismos hepatocitos (64, 181-187), las células de Ito o lipocitos perisinusoidales (188-190) y los miofibroblastos (191), tienen la posibilidad de expresar los genes correspondientes y tienen las enzimas necesarias para llevar a cabo las modificaciones postraduccionales. En el hígado normal los fibroblastos se encuentran situados en los tractos portales y en las venas centrales (192); en el hígado fibrótico se encuentran no sólo en los tractos fibrosos, sino además distribuidos por todo el parénquima (193).

Las células de Ito (189) o lipocitos perisinusoidales, son células cargadas de gotitas de grasa de tamaño uniforme, que en condiciones normales están encargadas de almacenar vitamina A (190,194). En los pacientes alcohólicos adquieren la capacidad de sintetizar colágeno (195,196). Se distribuyen en áreas del parénquima hepático con daño celular y en hepatocitos en degeneración hidrópica o necrosis, donde puede observarse un

depósito de fibras de colágeno en la zona correspondiente al espacio de Disse que adoptan una disposición pericelular (196). Las células de Ito son pues las responsables de la fibrosis sinusoidal, que es característica de las hepatopatías alcohólicas (195,196).

Los miofibroblastos son células que sólo se han observado en los hígados cirróticos; gozan de una capacidad contráctil y juegan un papel importante en el fenómeno de contracción de la cicatriz fibrótica que rodea a los nódulos de regeneración en la cirrosis (197).

FENOMENO DE CONTRACCION DE LA CICATRIZ.

Bhatal en 1972 (198) descubrió en el hígado una célula de morfología semejante a las células del musculo liso que se denominó miofibroblasto. Esta célula ha sido demostrada en la cirrosis alcohólica y en la producida por tetracloruro de carbono y no en el hígado normal. Los miofibroblastos se sitúan sobre los haces gruesos de colágeno que rodean a los llamados nódulos de regeneración (197,199). Se cree que estas células pueden estar involucradas en la producción de colágeno tipo I, III y V. Los miofibroblastos poseen además un aparato contráctil que está en contacto directo con el tejido conjuntivo extracelular a través de su membrana plasmática. La contracción de los miofibroblastos produciría un acortamiento y una torsión de los elementos conjuntivos extracelulares y sería responsable de la contracción de la cicatriz y disminución del tamaño hepático (197,199). Esto implicaría que los nódulos llamados de regeneración hepática se formarían por contracción activa de los miofibroblastos que estrangularían a los hepatocitos que quedan atrapados entre las fibras y no a través de un proceso pasivo, como

antes se aceptaba, de atrapamiento de los hepatocitos que se regeneran sobre fibras colágenas existentes.

Uno de los hechos más llamativos que ocurre en la cirrosis hepática en estadio terminal es la disminución en el tamaño hepático. Si bien este fenómeno podría explicarse por la necrosis hepatocitaria que acompaña a la cirrosis hepática, la contracción activa que producen los miofibroblastos contribuye de forma importante en esta reducción del volumen hepático (200).

ALTERACIONES METABOLICAS DE LA FIBROSIS HEPATICA  
ALCOHOLICA.

PROLINA Y ACIDO LACTICO EN EL METABOLISMO DEL  
ALCOHOL.

En la cirrosis hepática de cualquier etiología existen alteraciones en la síntesis y en la degradación de la prolina (200-202). La biosíntesis de prolina a partir de arginina está aumentada (203,204) y la enzima responsable de la degradación de prolina, prolil-oxidasa, está disminuida (205) de tal forma que el pool hepático de prolina aumenta por un incremento de su biosíntesis y por una disminución de su degradación.

Los pacientes con cirrosis de origen alcohólico y a diferencia de las cirrosis de otro origen presentan valores séricos de la prolina elevados (206). Los niveles de ácido láctico también se encuentran elevados en las cirrosis alcohólicas y directamente relacionados con los niveles séricos de prolina (18). No existe correlación entre los niveles de ácido láctico y los de alcohol en sangre (18). El ácido láctico es un potente inhibidor de la prolil-oxidasa

ALTERACIONES METABOLICAS DE LA FIBROSIS HEPATICA  
ALCOHOLICA.

PROLINA Y ACIDO LACTICO EN EL METABOLISMO DEL  
ALCOHOL.

En la cirrosis hepática de cualquier etiología existen alteraciones en la síntesis y en la degradación de la prolina (200-202). La biosíntesis de prolina a partir de arginina está aumentada (203,204) y la enzima responsable de la degradación de prolina, prolil-oxidasa, está disminuida (205) de tal forma que el pool hepático de prolina aumenta por un incremento de su biosíntesis y por una disminución de su degradación.

Los pacientes con cirrosis de origen alcohólico y a diferencia de las cirrosis de otro origen presentan valores séricos de la prolina elevados (206). Los niveles de ácido láctico también se encuentran elevados en las cirrosis alcohólicas y directamente relacionados con los niveles séricos de prolina (18). No existe correlación entre los niveles de ácido láctico y los de alcohol en sangre (18). El ácido láctico es un potente inhibidor de la prolil-oxidasa



(207) y se ha sugerido que el incremento del lactato es el responsable de los cambios séricos de la prolina. Se han encontrado pequeñas elevaciones del ácido láctico en sangre en pacientes voluntarios tras una intoxicación aguda (18), pero esta elevación es transitoria (200).

El incremento de ácido láctico sérico observado en los cirróticos alcohólicos indica la presencia de una disfunción, (anoxia, disminución de la utilización de ácido láctico, aumento de la producción de NADH), que no permite a estos pacientes, a diferencia de los sujetos sanos, compensar la elevación del NADH y los cambios en el sistema redox y normalizar las cifras de lactato (208). Es posible que la hiperlactacidemia en los alcohólicos refleje la existencia de un defecto metabólico, y quizás sea un marcador genético en la población susceptible para desarrollar una cirrosis (18). Sólo un tercio de los alcohólicos desarrolla cirrosis (209).

#### ACIDO LACTICO Y FIBROGENESIS.

El ácido láctico puede estimular la fibrogenesis hepática fundamentalmente por dos mecanismos:

1). El ácido láctico es un potente inhibidor de la prolil-oxidasa (207) y puede producir un incremento en el pool hepático de prolina (15,21) y en la prolina sérica (18,206). En el hígado cirrótico humano y en animales de experimentación se ha demostrado que el pool de prolina libre aumenta a valores que, in vitro, estimulan al máximo la síntesis de colágeno (203,204).

2). El ácido láctico incrementa la agregación de los monómeros inactivos de prolil-hidroxilasa en tetrámeros activos (96). Aunque no hay evidencia de que la prolil-hidroxilasa sea una enzima limitante, el aumento de su actividad puede facilitar la síntesis de colágeno.

### DAÑO HEPATICO Y RESPUESTA FIBROGENICA.

Se han propuesto dos hipótesis para explicar los mecanismos por los que el daño celular hepatocitario estimula la fibrogénesis hepática.

La primera de ellas sostiene que el daño hepático produce la activación de las células de Kupffer y la llegada de otros elementos inflamatorios al lugar de la lesión (210). Estas células producen diversos factores (fibronectina, cininas (linfocinas, monocinas) y prostaglandinas) que estimulan la síntesis de colágeno (mediante los fibroblastos y miofibroblastos (hígado cirrótico)) y modifican la presión intraluminal en el espacio de Disse. De acuerdo con esta hipótesis, las alteraciones hemodinámicas y algunas alteraciones en la función hepática son secundarias al acúmulo de colágeno (211,212).

La segunda de las hipótesis defiende que el consumo de alcohol produce un aumento del tamaño de los hepatocitos (213,214) y un aumento de la presión intraluminal en el espacio de Disse (215), secundario a este cambio de volumen hepatocitario, que estimula la síntesis de colágeno. De acuerdo con esta teoría el acúmulo

de colágeno es secundario a los cambios hemodinámicos.

Uno de los aspectos más importantes de las enfermedades crónicas del hígado, independientemente de cual de las dos teorías anteriores sea la cierta, es la falta o al menos disminución de la regeneración hepática y predominio de la cicatrización. Cuando en el hígado existe un daño celular masivo con destrucción de un número grande de hepatocitos, se produce una pérdida súbita de parénquima funcionante que estimula la regeneración hepática. Si el daño es único y el paciente sobrevive debido al buen funcionamiento de las células hepáticas no afectadas, o por las medidas médicas sustitutivas utilizadas, el hígado regenera y en pocas semanas se restablece su integridad anatómica y funcional (216,217). En estos casos no es posible encontrar una cicatriz en el hígado debido a que ha predominado la regeneración sobre el proceso cicatricial.

Cuando el daño es de menor intensidad el estímulo para la regeneración hepática puede ser pequeño. Sin embargo este pequeño estímulo puede ser suficiente para activar las células de

Kupffer y estimular el depósito de fibras de colágeno formando una pequeña cicatriz (210). Si el estímulo inductor del daño celular prosigue como en el caso del alcoholismo, el proceso cicatricial continúa, produciéndose primero una fibrosis y luego una cirrosis. Bajo estas condiciones la regeneración hepática es mínima o inexistente y el fenómeno cicatricial es el que predomina (200,210).

DINAMICA DE LA FIBROSIS HEPATICA: BIOSINTESIS  
VERSUS DEGRADACION.

El acúmulo excesivo de colágeno hepático puede ser el resultado del aumento de su síntesis, disminución de la degradación o la combinación de ambos procesos (20,22,73,193,200,210, 218-221).

En las fases iniciales del proceso, el acúmulo de colágeno se debe preferentemente a un aumento de su biosíntesis. Tanto en hígados humanos como en hígados de animales tratados con tetracloruro de carbono o infestados con esquistosomiasis, la incorporación de prolina radioactiva en el colágeno está aumentada (21, 200-204,210,219). Así mismo se ha referido un aumento de actividad prolil-hidroxilasa en tejido hepático. En estas fases iniciales la acción colagenolítica puede encontrarse normal o inclusive aumentada (222-229).

Estudios realizados también en modelos experimentales sugieren que el proceso de síntesis perdura mientras el agente etiológico está presente. Tanto la síntesis aumentada de colágeno como las alteraciones metabólicas relacionadas con la fibrogénesis regresan a la normalidad a

las dos semanas de finalizar el tratamiento con tetracloruro de carbono en ratas que fueron intoxicadas durante un período de siete semanas (205,230).

Según los datos anteriores la cirrosis hepática debería ser reversible si se suspende el agente etiológico (abstinencia de bebidas alcohólicas). Sin embargo, dependiendo del estadio de la fibrosis hepática y de factores genéticos y metabólicos aún no bien clarificados, la fibrosis puede continuar hasta cirrosis, independientemente de que el agente etiológico esté o no presente. Para ello se han desarrollado varias hipótesis. Una de ellas sugiere la formación de anticuerpos contra algunas proteínas del hígado del huésped; estos anticuerpos perpetuarían el daño hepático, manteniéndose por consiguiente el aumento de la síntesis de colágeno (231,232). Otra hipótesis sugiere una disminución en la producción de colagenasa. Aunque la síntesis retornara a la normalidad, la disminución en la degradación del colágeno produciría un aumento en la fibrosis hepática (22). La falta de degradación del colágeno puede ser debida a varias causas como una disminución en

la producción de la enzima debido a la lesión hepática misma o al cambio en las poblaciones celulares a medida que avanza el proceso. La celularidad del tejido conjuntivo cicatricial disminuye con la maduración de la cicatriz. La falta de degradación del colágeno podría ser también debida a un cambio en la susceptibilidad del sustrato a la enzima (233). En los hígados fibróticos existe un aumento del colágeno tipo IV, que es resistente a la acción de la colagenasa hepática (229).

Estudios en los que se ha medido la actividad colagenolítica en tejido hepático indican que en los estadios avanzados de la enfermedad existe una disminución de la actividad colagenasa (234). Al mismo tiempo los estudios realizados con anticuerpos fluorescentes anticolagenasa han indicado que en los hígados normales o con fibrosis mínima la enzima se distribuye por todas las fibras de colágeno independientemente de su localización o grosor. A medida que el proceso avanza, la enzima desaparece de la parte central de las fibras gruesas y sólo se encuentra en la periferia de las mismas. En las cirrosis de estadio avanzado no se detecta esta



enzima (235,236).

Los factores determinantes de la fibrosis serían pues el aumento de la biosíntesis de colágeno en las fases iniciales y la falta de degradación, por una disminución de la producción de colagenasa o por falta de accesibilidad del sustrato a la enzima, en las fases avanzadas.

### METODOS PARA MEDIR LA FIBROSIS.

La importancia de la fibrosis en la progresión de las lesiones hepáticas inducidas por el alcohol (21,211,212) y la posibilidad de ensayar nuevas terapéuticas con la finalidad de intentar detener o al menos retrogradar el depósito de fibras de colágeno (21-36), han estimulado en los últimos años la búsqueda de nuevos métodos capaces de medir de la forma más precisa posible la cantidad de colágeno hepático y las alteraciones de su síntesis normal. Entre estos métodos podemos distinguir el examen de la biopsia hepática, determinaciones en tejido hepático y finalmente métodos serológicos (tabla V).

### EXAMEN DE LA BIOPSIA HEPATICA.

El examen cuidadoso de la biopsia hepática mediante tinciones especiales como el tricrómico de Masson sigue siendo una de las pruebas más fiables para estimar de forma semicuantitativa la fibrosis. Esta valoración de la fibrosis en la biopsia puede completarse con la utilización de métodos histomorfométricos(237) que aunque son algo mas precisos, son muy laboriosos.

T A B L A V

ENZIMAS, AMINOACIDOS O PEPTIDOS QUE HAN SIDO UTILIZADOS PARA CUANTIFICAR ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DEL COLAGENO.

	<u>Biopsia</u>	<u>Suero/Plasma</u>	<u>Orina</u>
Prolina	+	+	+
Prolil-hidroxilasa			
(a) actividad	+	+	-
(b) inmunorreactiva	+	+	-
Galactosilhidroxilisil-			
glucosiltransferasa	+	+	-
Péptidos del procolágeno			
(a) tipo I	-	+	-
(b) tipo III	-	+	+
Lisiloxidasa	+	+	-
Colagenasa	+	-	-

Hasta la actualidad el examen de la biopsia hepática sigue siendo el método más fiable para cuantificar la fibrosis.

#### DETERMINACIONES EN TEJIDO HEPATICO.

##### - Prolina.

Una de las características del colágeno es la composición de sus aminoácidos, que incluyen un elevado índice de prolina e hidroxiprolina. Tanto en condiciones fisiológicas como patológicas en las que existe un aumento de la síntesis y depósito de fibras de colágeno se produce un aumento del pool de prolina libre que es proporcional al colágeno sintetizado y depositado en el hígado (18,238-240). La elevación de la prolina libre de 0,2 mM en el hígado normal a 0,48 mM en la cirrosis, es debida en parte al aumento de su biosíntesis a partir de sus aminoácidos precursores (arginina, ornitina) (201,204) y a la disminución de su degradación por la enzima mitocondrial denominada prolil-oxidasa (205).

El método para la determinación de la prolina se basa en la oxidación de la prolina con cloramina-T, extracción del producto oxidado en

tolueno y análisis de la prolina con ninhidrina, ácido acético y fosfórico (241). Un método alternativo para la determinación de la prolina es su separación en cromatografía de intercambio iónico y posteriormente su determinación con ninhidrina. El método tiene el inconveniente de no poder ser aplicado a pequeñas muestras hepáticas y además no aporta información acerca de la actividad de la enfermedad.

- Enzimas intracelulares.

Dentro de las enzimas intracelulares que intervienen en la síntesis de colágeno podemos destacar la determinación de la actividad prolil-hidroxilasa y galactosilhidroxilisil-glicosiltransferasa en tejido hepático.

La prolil-hidroxilasa es la enzima responsable de la hidroxilación de la prolina en cadenas proalfa del procolágeno. La 4 prolil-hidroxilasa hidroxila el carbono 4 de la prolina situada en posición Y del triplete Gli-X-Y y la 3 prolil-hidroxilasa hidroxila el carbono 3 del residuo de prolina situado en posición X (94,95). En el hígado la enzima más abundante es la 4 prolil-hidroxilasa.

En 1974 McGee et al (242) basados en el

método descrito previamente por Hutton et al (95), lograron determinar la actividad prolil-hidroxilasa en el espécimen de una biopsia hepática, reservando incluso parte del tejido para establecer el diagnóstico histológico. Posteriormente han aparecido varios trabajos en la literatura médica mostrando elevaciones de la actividad prolil-hidroxilasa, en hígados de pacientes afectados de fibrosis progresiva por hepatitis alcohólica, hepatitis crónica activa o cirrosis activas (243-249). La actividad de la enzima en tejido aumenta antes de que pueda observarse el depósito de colágeno (250,251). Mann et al en 1979 (248) determinaron la actividad prolil-hidroxilasa en un grupo de pacientes alcohólicos con diversas hepatopatías (esteatosis, hepatitis alcohólica y cirrosis). Los valores medios obtenidos en todos los pacientes con hepatopatía alcohólica fueron significativamente superiores, a excepción de los pacientes que presentaban esteatosis sólo, a los que presentaron los pacientes alcohólicos con histología hepática normal. Los pacientes con cirrosis inicial tuvieron valores significativamente superiores a los de los restantes grupos. En los estadios de

cirrosis avanzada la actividad de la enzima fue menor a la que presentaron los pacientes con cirrosis inicial. En este estudio existió una buena correlación entre los niveles de actividad de la prolil-hidroxilasa y la síntesis del colágeno.

La prolil-hidroxilasa es esencial para la maduración normal del colágeno que ocurre en los fibroblastos (252,253) y que se detecta en las heridas cicatriciales y en los tejidos de granulación (254-256). También se ha encontrado un incremento de la actividad de la enzima en pulmón (257,258), y probablemente en otros órganos parenquimatosos, consecutivo a un daño celular agudo. Se asocia generalmente con una elevación en la síntesis de colágeno, que es transitoria a menos que el agente inductor de la lesión prosiga. Existen en la actualidad evidencias bioquímicas e inmunológicas de que las células del parénquima hepático contienen prolil-hidroxilasa en forma activa (181,259) y que participa en la síntesis de colágeno. En hepatocitos aislados, la prolil-hidroxilasa aumenta unas cuatro veces su valor durante la regeneración hepática (181, 250). Las células no parenquimatosas del hígado

(células mesenquimales) también contienen prolilhidroxilasa, y su concentración es dos veces superior que la existente en las células parenquimatosas (259).

La determinación de la actividad prolilhidroxilasa por el método de Hutton et al (95) está fundamentada en la reacción de hidroxilación de la prolina. La transformación de un mol de prolina en hidroxiprolina da lugar a la formación de un mol de agua. Si se utiliza prolina tritiada da lugar a la formación de agua tritiada. El ensayo requiere la preparación previa de un sustrato marcado, utilizándose para ello embrión de pollo al que se le añade prolina tritiada en posición 3 y 4. Los pasos fundamentales de esta técnica son la homogeneización del tejido hepático, incubación con el sustrato marcado, centrifugación y destilación del agua tritiada del medio de incubación. La radioactividad presente en el agua tritiada se valora mediante un contador de centelleo líquido. El resultado puede expresarse en cpm, dpm o mU por mg de proteína del homogeneizado de tejido hepático (260). Las proteínas se determinan por el método de Lowry (261).



La galactosilhidroxilisil-glucosiltrans-ferasa (GGT) cataliza la biosíntesis de la glucosilgalactosilhidroxilisina en el proceso intracelular de la síntesis de colágeno, transfiriendo la unidad del monosacárido UDP-glucosa a los residuos de galactosilhidroxilisina en las cadenas proalfa.

Se han descrito incrementos de la GGT en tejido hepático de ratas sometidas a estímulos fibrogénicos (250,251). En un grupo de pacientes con cirrosis biliar primaria y otros tipos de cirrosis, la GGT se elevó más de dos veces la desviación standard por encima de la media.

El método para su determinación está basado (262) en la transferencia de glucosa-<sup>14</sup>C de UDP-glucosa-<sup>14</sup>C a los residuos de galactosilhidroxilisina en un sustrato formado por colágeno desnaturalizado, y en la medición de la radioactividad de la glucosilgalactosilhidroxilisina, que es liberada por hidrólisis alcalina y purificada por cromatografía de intercambio iónico. La actividad de la GGT se expresa en U/g de proteína del homogeneizado de tejido hepático.

El ensayo es complejo y no aporta más datos que la determinación de la actividad prolif-

hidroxilasa.

#### DETERMINACIONES EN LIQUIDOS BIOLÓGICOS.

Las determinaciones en líquidos biológicos de enzimas o sustancias relacionadas con el metabolismo del colágeno gozan de la ventaja de poder obtener las muestras cuantas veces se precise, e incluso en presencia de alteraciones muy severas de la función hepática. Su mayor inconveniente radica en que no son siempre un fiel reflejo de la actividad fibrogénica hepática.

##### - Prolina y ácido láctico.

Mata et al en 1975 (206) determinaron la concentración sérica de prolina en un grupo de 71 pacientes con diversas enfermedades del hígado (60 pacientes con cirrosis (25 de origen alcohólico), 11 pacientes con enfermedades crónicas activas del hígado y un grupo control formado por 62 pacientes). Sólo los pacientes con cirrosis alcohólica presentaron valores séricos de prolina significativamente superiores a los del grupo control. Además los pacientes con hepatitis alcohólica presentaron valores significativamente superiores a los de los otros grupos.

Tanto el ácido láctico en sangre como la

prolina sérica aumentan en los cirróticos alcohólicos (18,263,264). La hiperprolinemia de los cirróticos alcohólicos está en relación con la hiperlactacidemia (18). El ácido láctico regula el depósito de prolina en el hígado al inhibir la prolil-oxidasa (207). El ácido láctico activa la enzima 4 prolil-hidroxilasa, en cultivo de fibroblastos, facilitando la agregación de las subunidades monoméricas de la enzima en tetrameros (96).

En pacientes con cirrosis hepática alcohólica, en quienes la prolina sérica y el lactato sanguíneo se elevan, se observa un descenso de ambos parámetros a la normalidad después del tratamiento con colchicina (droga con capacidad antifibrogénica) (18,36). Todos estos datos han llevado a proponer a la prolina sérica y al lactato sanguíneo como marcadores de fibrogénesis en la cirrosis alcohólica. El hallazgo de una elevación de ambos parámetros en alcohólicos sin enfermedad hepática previa conocida, podría indicar la presencia de enfermedad hepática o susceptibilidad para desarrollarla (18).

Para la determinación de la prolina, previamente se deben desproteínizar 4 ml de suero

con tricloracético, en frío, al 50%. El sobrenadante se neutraliza a pH 5-7 y se efectúa la determinación de la prolina (18,241).

La determinación del ácido láctico se efectúa con deshidrogenasa láctica midiendo la formación de piruvato o la reducción del  $\text{NAD}^+$  (265). Las muestras sanguíneas para la determinación de ácido láctico deben obtenerse sin torniquete y la determinación debe hacerse en muestras frescas.

- Prolil-hidroxilasa sérica.

La actividad prolil-hidroxilasa sérica ha sido determinada en animales con cirrosis experimental (266), y en pacientes con diversas hepatopatías (267). Sin embargo los cambios en la actividad enzimática pueden no correlacionarse con la síntesis activa de colágeno. Se ha demostrado la existencia de un inhibidor en el suero que podría ser el responsable del sesgo de los resultados, dependiendo de la concentración del inhibidor (268). No existe además correlación entre la actividad enzimática del suero y la actividad enzimática en tejido hepático (269).

La prolil-hidroxilasa ha sido también determinada en muestras séricas y en tejido hepá-

tico por medio de un método radioinmunológico. La prolil-hidroxilasa fue determinada por un método inmunoreactivo en un grupo de 65 pacientes con diversas hepatopatías, observándose que los niveles séricos de la enzima se correlacionaron de forma significativa con la actividad prolil-hidroxilasa en tejido hepático y con la prolil-hidroxilasa inmunoreactiva en tejido hepático (269).

- Galactosilhidroxililil-glucosiltransferasa sérica (GGT).

La GGT ha sido determinada en suero humano. Un estudio preliminar realizado con un grupo de pacientes hospitalizados con diversas enfermedades, evidenció elevaciones séricas de la enzima en pacientes afectos de hepatitis aguda, ictericia obstructiva, ictericia recurrente del embarazo o metástasis óseas (270).

La actividad sérica de la GGT se encontró elevada en 11 de 13 pacientes con cirrosis biliar primaria, 4 de 7 con cirrosis no alcohólicas, 4 con hepatitis agudas y en 7 con metástasis hepáticas. Por el contrario se encontraron niveles bajos en pacientes con esteatosis hepática, colangitis y colestasis extrahepáticas y

en 7 de los 14 pacientes con cancer sin metástasis hepáticas. La actividad GGT en tejido hepático se encontró elevada en los mismos casos de elevación sérica y existió una relación significativa entre ambos parámetros. La actividad sérica de la GGT se correlacionó con los niveles séricos de la prolil-hidroxilasa inmunoreactiva y la actividad hepática de la GGT con la actividad hepática de la prolil-hidroxilasa. No existió relación entre los niveles de actividad sérica de la GGT y la determinación de la prolil-hidroxilasa inmunorreactiva en tejido hepático. Existió una correlación muy débil entre la actividad sérica y hepática de la GGT (262).

El número de casos analizando tanto la GGT en suero como en tejido hepático, es pequeño y siempre ha sido realizado por el mismo grupo de investigadores.

- Péptidos terminales del procolágeno tipo I y tipo III.

Las distintas propiedades antigénicas demostradas en los tipos I y III del colágeno, han servido para la preparación de anticuerpos específicos, utilizados en inmunofluorescencia o en radioinmunoanálisis (271). Los extremos aminoter-

minal y carboxiterminal del procolágeno son escindidos por peptidasas específicas a nivel extracelular, en el proceso de síntesis del colágeno (82,94). No se conoce bien la función de estos péptidos una vez escindidos, pero podrían ejercer una inhibición de la síntesis de colágeno mediante un mecanismo de retroalimentación negativo.

El procolágeno ha sido demostrado por métodos de inmunofluorescencia en el estroma del hígado humano, tanto normal como fibrótico (272). Mediante el desarrollo de un radioinmunoanálisis para el péptido carboxiterminal del procolágeno tipo I (P-I-P) (273) y otro para el péptido aminoterminal del procolágeno tipo III (P-III-P) (274), se han podido detectar estos péptidos en el suero de personas sanas y también en la ascitis. El P-I-P ha sido también hallado en el líquido cefalorraquídeo, sinovial, amniótico y no en orina (273), mientras que el P-III-P lo ha sido en orina (274). Mediante métodos cromatográficos se han encontrado fragmentos en suero (275) y ascitis (274) de 45.000 daltons que corresponden al P-III-P; en orina se han encontrado péptidos de menor tamaño que corresponden

a productos de degradación del P-III-P (274,276).

El P-I-P fue investigado por Taubman et al en un grupo amplio de pacientes con enfermedades hepáticas. Estos autores encontraron elevaciones del péptido en 18 de los 78 casos (23%) de pacientes con hepatopatía alcohólica (273). En los pacientes con una enfermedad de Paget se ha observado aún una mayor incidencia en la elevación del P-I-P sérico (277).

Rohde et al (274) estudiaron los niveles del P-III-P en varios grupos de pacientes: sujetos normales, pacientes con hepatopatía alcohólica, hepatitis aguda, hepatitis crónica, miscelánea de enfermedades hepáticas que incluían esteatosis no alcohólicas y carcinoma primitivo hepático, artritis reumatoide y un grupo de enfermedades sistémicas. Estos autores encontraron un aumento entre 2 y 20 veces los valores del citado péptido, respecto a los sujetos normales en los pacientes con hepatopatía alcohólica, de 15 a 17 veces en los pacientes con hepatitis aguda y de 10 a 14 en aquellos con hepatitis crónica activa. Los pacientes con artritis reumatoide u otras enfermedades mostraron elevaciones muy moderadas del P-III-P en suero. En las hepatopatías



alcohólicas los niveles de inflamación y necrosis observados al microscopio óptico se correlacionaron bien con los niveles séricos del P-III-P pero no con otros parámetros de laboratorio que miden la función hepática.

Posteriormente otro estudio efectuado en pacientes portadores de hepatitis crónica, ha demostrado la existencia de una relación entre los niveles séricos del P-III-P y la fibrosis cuantificada en la biopsia hepática (278).

Niemela et al (279) en un reciente estudio desarrollado en un grupo de pacientes con hepatopatía alcohólica encuentra valores del P-III-P progresivamente elevados según la gravedad de la hepatopatía. Existe sin embargo una superposición importante de los valores que no permiten a este parámetro por si solo distinguir entre las distintas lesiones hepáticas producidas por el alcohol.

Se han descrito elevaciones del P-III-P en otras enfermedades extrahepáticas como la esclerodermia, la fibrosis pulmonar y la mielofibrosis (274,280).

El método para la determinación del P-III-P se basa en un radioinmunoensayo que utiliza para

su preparación procolágeno tipo III de piel de ternero afecto de dermatosparaxis, marcado con yodo radioactivo (274).

El P-III-P es eliminado por el riñón mediante filtración glomerular (274,281). Los niveles del péptido aumentan en la insuficiencia renal y vuelven a niveles normales cuando se restaura la función renal (281).

### FARMACOS ANTIFIBROGENICOS

En la actualidad se considera que en algunos casos, la cirrosis hepática puede ser curable. Esta afirmación optimista se fundamenta en observaciones que han sido publicadas sobre la reversibilidad de algunos casos de cirrosis hepática (21,22) y en los resultados obtenidos en estudios experimentales en animales y en humanos (36,230,282-286).

Al demostrarse que la fibrosis era un mecanismo común a través del cual diversos agentes etiológicos, químicos y biológicos, podían dar lugar a una cirrosis, fue cuando se inició el empleo de agentes con probable capacidad antifibrogénica (tabla VI), en el manejo terapéutico de los pacientes con cirrosis (200,210). De todas estas drogas las más utilizadas, por su mayor efectividad y menor número de efectos secundarios, han sido la penicilamina (36,287) y aún más la colchicina. La acción de ambas drogas sobre el metabolismo del colágeno se resume en la figura 5.

La penicilamina se combina con los grupos aldehídos de las moléculas de colágeno que intervendrán en la formación de enlaces intramole-

T A B L A VI

FARMACOS CON ACTIVIDAD ANTIFIBROGENICA.

- Análogos de la prolina.
- Agentes quelantes del hierro.
- Agentes latirogénicos.
- Penicilamina.
- Colchicina.
- Corticosteroides.

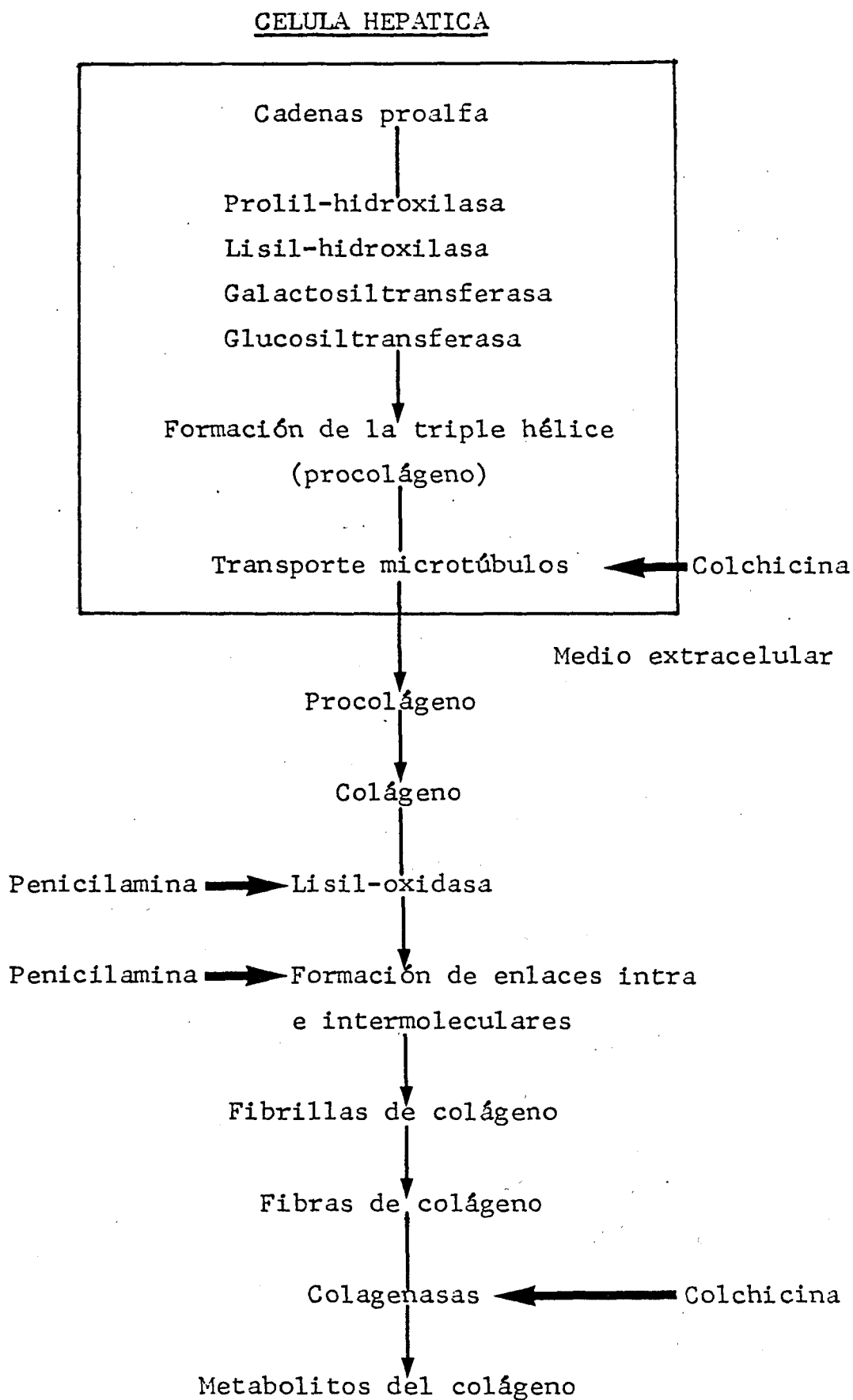


Figura 5.

culares e intermoleculares. A concentraciones elevadas inhibe la lisil-oxidasa. Al suspender el tratamiento, la unión de la penicilamina a los grupos aldehído disminuye y se produce una formación masiva de enlaces covalentes (21).

La colchicina inhibe la polimerización de la tubulina para formar microtúbulos (117) y de esta forma inhibe el movimiento transcelular del colágeno (288). Aumenta la producción de colagenasa in vitro. Inhibe la producción de mediadores e inhibe su interacción con las células efectoras que establecen la interrelación del proceso inflamatorio con la producción de colágeno (289,290). Uno de sus metabolitos la colchiceína, protege membranas y estabiliza enzimas con grupos SH (200). A nivel de la membrana plasmática celular la colchicina produce una modificación del sistema adenilciclase en el hígado y los niveles de AMP cíclico en los leucocitos (291,292). Este efecto sobre el hígado es probablemente el que explica la elevación de la fosfatasa alcalina que se observa tras la administración de colchicina (36,293,294).

Kershenobich et al publicaron en 1979 un estudio en el que utilizaron colchicina en el

tratamiento de 100 pacientes cirróticos, durante un periodo medio de 5 años (36). En estos pacientes se observó una importante mejora clínica y de las pruebas de laboratorio e incluso en algunos casos histológica con disminución de la fibrosis.

En los pacientes con cirrosis alcohólica tratados con colchicina se ha observado un descenso de la prolina sérica y del lactato tras el tratamiento (18,36).

Quizás el aspecto más importante de estos estudios preliminares sobre el uso de colchicina en la cirrosis hepática sea la posibilidad de que se modifique la historia natural de la cirrosis. Con estos datos existe la posibilidad de desarrollar nuevas drogas antifibrogénicas que modifiquen la evolución de la enfermedad. La evaluación sobre la efectividad del tratamiento con nuevas drogas antifibrogénicas deberá apoyarse en parámetros que permitan medir de forma precisa la fibrosis hepática (295).